

- For more records, click the Records link at page end.
- To change the format of selected records, select format and click Display Selected.
- To print/save clean copies of selected records from browser click Print/Save Selected.
- To have records sent as hardcopy or via email, click Send Results.

<input checked="" type="checkbox"/> Select All			Format
<input checked="" type="checkbox"/> Clear Selections	Print/Save Selected	Send Results	Display Selected Free

1. 9/5/1 DIALOG(R)File 352:Derwent WPI (c) 2004 Thomson Derwent. All rts. reserv.

013099580

WPI Acc No: 2000-271452/200023

XRAM Acc No: C00-082944

XRPX Acc No: N00-203233

New maize replication protein A useful for genetic transformation, gene targeting in plants and modulating DNA metabolism

Patent Assignee: PIONEER HI-BRED INT INC (PION-N)

Inventor: MAHAJAN P; MAHAJAN P B

Number of Countries: 090 Number of Patents: 007

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
WO 200015816	A2	20000323	WO 99US21277	A	19990915	200023 B
AU 9960424	A	20000403	AU 9960424	A	19990915	200034
EP 1114170	A2	20010711	EP 99969117	A	19990915	200140
			WO 99US21277	A	19990915	
JP 2003510009	W	20030318	WO 99US21277	A	19990915	200321
			JP 2000570343	A	19990915	
US 6538176	B1	20030325	US 98100690	P	19980917	200325
			US 99123896	P	19990311	
			US 99396149	A	19990915	
US 20030159185	A1	20030821	US 98100690	P	19980917	200356
			US 99123896	P	19990311	
			US 99396149	A	19990915	
			US 2003372686	A	20030221	
US 20030163840	A1	20030828	US 98100690	P	19980917	200357
			US 99123896	P	19990311	
			US 99396149	A	19990915	
			US 2003371558	A	20030221	

Priority Applications (No Type Date): US 99123896 P 19990311; US 98100690 P 19980917; US 99396149 A 19990915; US 2003372686 A 20030221; US 2003371558 A 20030221

Patent Details:

Patent No Kind Lan Pg Main IPC Filing Notes

WO 200015816 A2 E 101 C12N-015/82

Designated States (National): AE AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY CA CH CN CR CU CZ DE DK DM EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MD MG MK MN MW MX NO NZ PL PT RO RU SD SE SG SI SK SL TJ TM TR TT TZ UA UG US UZ VN YU ZA ZW

Designated States (Regional): AT BE CH CY DE DK EA ES FI FR GB GH GM GR IE IT KE LS LU MC MW NL OA PT SD SE SL SZ TZ UG ZW

AU 9960424 A Based on patent WO 200015816

EP 1114170 A2 E C12N-015/82 Based on patent WO 200015816

Designated States (Regional): AL AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LT LU LV MC MK NL PT RO SE SI

JP 2003510009 W 125 C12N-015/09 Based on patent WO 200015816

US 6538176 B1 A01H-005/00 Provisional application US 98100690

Provisional application US 99123896

US 20030159185 A1 A01H-005/00 Provisional application US 98100690

Provisional application US 99123896

Div ex application US 99396149

Div ex patent US 6538176

US 20030163840 A1 A01H-001/00 Provisional application US 98100690

Provisional application US 99123896
Div ex application US 99396149
Div ex patent US 6538176

Abstract (Basic): WO 200015816 A2

NOVELTY - An isolated protein which is maize replication protein A (RPA), is new.

DETAILED DESCRIPTION - Isolated maize replication protein A (RPA) has an amino acid (aa) sequence of:
(1) a maize RPA large subunit;
(2) a plant RPA middle subunit;
(3) defined sequences of 623 and 617 aa encoding the maize RPA large subunit homologues 1 and 2 (ZmRPALSH1 and ZmRPALSH2) respectively, 273 aa encoding the maize middle subunit homologue 1 (ZmRPAMSH1), and 273 aa encoding ZmRPAMSH2 and 3, 273 aa encoding ZmRPAMSH4, 318 aa encoding ZmRPAMSH5, 273 aa encoding ZmRPAMSH6 and 273 aa encoding ZmRPAMSH7 (all sequences given in the specification);

(4) substantial identity to an aa sequence of (1)-(3);

(5) at least 20 contiguous residues of (1)-(3); or

(6) a variant of (1)-(3).

RPA is a single-stranded DNA-binding protein required for multiple processes in DNA metabolism, including DNA replication, DNA repair and recombination.

INDEPENDENT CLAIMS are also included for the following:

(1) an isolated nucleic acid (I) which is:

(a) a nucleotide sequence encoding a maize RPA large subunit;

(b) a nucleotide sequence encoding a plant RPA middle subunit;

(c) a nucleotide sequence comprising a defined sequence given in the specification of 2497, 2202, 1124, 979, 1051, 1087 or 1074 base pairs encoding ZmRPALSH1, ZmRPALSH2 and ZmRPAMSH1-7;

(d) a nucleotide sequence comprising at least 20 contiguous nucleotides of sequences (a)-(c);

(e) an antisense nucleotide sequence corresponding to (a)-(c); or

(f) a nucleotide sequence which hybridizes under stringent conditions to (a)-(c);

(2) a DNA construct comprising (I) operably linked to a promoter that drives expression in a plant cell;

(3) a transformed plant cell comprising a DNA construct of (2) stably incorporated into its genome;

(4) a transformed plant comprising a DNA construct of (2) stably incorporated into its genome;

(5) seed from the plant of (4);

(6) a method for modulating DNA metabolism or influencing cell cycle in a plant cell comprising transforming a plant cell with (I) operably linked to a heterologous promoter that drives expression in a plant cell;

(7) a method for enhancing homologous recombination in a plant cell comprising transforming a plant cell with (I) (where (I) is not the antisense sequence) operably linked to a heterologous promoter that drives expression in a plant cell; and

(8) a method for increasing pathogen resistance in a plant cell comprising transforming the plant cell with at least one nucleotide sequence operably linked to a pathogen-inducible promoter, the nucleotide sequence is:

(i) an antisense nucleotide sequence corresponding to a maize RPA large subunit; or

(ii) an antisense nucleotide sequence corresponding to a plant RPA middle subunit.

ACTIVITY - Fungicide; virucide; insecticide.

No biological data given.

MECHANISM OF ACTION - Gene therapy.

USE - DNA encoding RPA is used for modulating DNA metabolism, influencing cell cycle, enhancing homologous recombination and increasing pathogen resistance in a plant cell (all claimed).

Antisense sequences can be used to block RPA expression and promote

non-specific recombination events.

RPA is required for nucleotide excision repair and double stranded DNA break repair. Providing RPA protein as a coating to particles during particle bombardment or expressing RPA sequences during homologous recombination can improve genetic manipulation.

(I) or a portion of (I) may be used as a probe which can hybridize to corresponding RPA sequences and mRNA to isolate additional coding sequences or in a diagnostic assay to determine the presence of coding sequences in a plant.

(I) is used for increasing pathogen resistance (claimed) through activation of inducible or tissue preferred promoters linked to an RPA antisense construct which inhibits endogenous RPA expression to selectively kill target cells or tissues. Plant pests which can be controlled in this manner include fungal pathogens, viruses, nematodes and insects.

pp: 101 DwgNo 0/4

Title Terms: NEW; MAIZE; REPLICA; PROTEIN; USEFUL; GENETIC; TRANSFORM; GENE
; PLANT; MODULATE; DNA; METABOLISM

Derwent Class: C06; D16; P13

International Patent Class (Main): A01H-001/00; A01H-005/00; C12N-015/09;
C12N-015/82

International Patent Class (Additional): C07H-021/04; C07K-014/415;
C12N-005/04; C12N-005/10; C12N-009/22; C12N-015/00; C12N-015/11;
C12Q-001/68

File Segment: CPI; EngPI

Derwent WPI (Dialog® File 352): (c) 2004 Thomson Derwent. All rights reserved.

☒ Select All
☒ Clear Selections

Print/Save Selected

Send Results

Display Selected

Format
Free

© 2004 Dialog, a Thomson business

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する、単離されたタンパク質： a) トウモロコシ複製タンパク質A大サブユニットのアミノ酸配列； b) 植物の複製タンパク質A中サブユニットのアミノ酸配列； c) 配列番号2、配列番号4、配列番号12、配列番号14、配列番号16または配列番号18に示されるアミノ酸配列； d) c) のアミノ酸配列に対して少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列；

e) 配列番号14、配列番号16または配列番号18に示されるアミノ酸配列の少なくとも20の連続する残基を含むアミノ酸配列； f) 配列番号2または配列番号4に示されるアミノ酸配列の少なくとも50の連続する残基を含むアミノ酸配列；および g) c) のアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列。 【請求項2】 以下からなる群より選択される、単離されたヌクレオチド配列：

a) トウモロコシ複製タンパク質A (RPA) 大サブユニットをコードするヌクレオチド配列； b) 植物の複製タンパク質A (RPA) 中サブユニットをコードするヌクレオチド配列； c) 配列番号1、配列番号3、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19または配列番号21に示されるヌクレオチド配列；

d) 配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19または配列番号21に示されるヌクレオチド配列の少なくとも20の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列； e) 配列番号1または配列番号3に示されるヌクレオチド配列の少なくとも45の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列；

f) a)、b) またはc) のヌクレオチド配列に対応するアンチセンスヌクレオチド配列； g) 配列番号1のヌクレオチド配列にストリンジェント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列であって、ここで、該ヌクレオチド配列は、配列番号1のヌクレオチド配列に対して少なくとも90%の同一性を有する、少なくとも45ヌクレオチドを含む、ヌクレオチド配列； h) 配列番号3のヌクレオチド配列にストリンジェント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列であって、ここで、該ヌクレオチド配列は、配列番号3のヌクレオチド配列に対して少なくとも85%の同一性を有する、少なくとも75ヌクレオチドを含む、ヌクレオチド配列； i) c) のヌクレオチド配列に対して少なくとも80%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、ヌクレオチド配列； j) c) のヌクレオチド配列に対して少なくとも90%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、ヌクレオチド配列；および k) 請求項1に記載のアミノ酸配列をコードする、ヌクレオチド配列。 【請求項3】

請求項2に記載のヌクレオチド配列を含むDNA構築物であって、該ヌクレオチド配列が、植物細胞において発現を駆動するプロモーターに作動可能に連結されている、DNA構築物。 【請求項4】 前記プロモーターが、組織選択的プロモーターである、請求項3に記載のDNA構築物。 【請求項5】 前記プロモーターが、病原体誘導性プロモーターである、請求項4に記載のDNA構築物。 【請求項6】 前記ヌクレオチド配列が、アンチセンス配列である、請求項5に記載のDNA構築物。 【請求項7】 前記プロモーターが、構成的プロモーターである、請求項3に記載のDNA構築物。 【請求項8】 植物細胞における相同組換えを増強するための方法であって、該方法は、植物細胞において発現を駆動する異種プロモーターに作動可能に連結された少なくとも1つのヌクレオチド配列で該植物細胞を形質転換する工程を包含し、該ヌクレオチド配列は、以下：

a) トウモロコシ複製タンパク質A (RPA) 大サブユニットをコードするヌクレオチド配列； b) 植物の複製タンパク質A (RPA) 中サブユニットをコードするヌクレオチド配列； c) 配列番号1、配列番号3、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19または配列番号21に示されるヌクレオチド配列； d) 配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19または配列番号21に示されるヌクレオチド配列の少なくとも20の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列； e) 配列番号1または配列番号3に示されるヌクレオチド配列の少なくとも45の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列； f) c) のヌクレオチド配列に対して少なくとも80%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、ヌクレオチド配列； g) c) のヌクレオチド配列に対して少なくとも90%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、ヌクレオチド配列；および h) 請求項1に記載のアミノ酸配列をコードする、ヌクレオチド配列、からなる群より選択される、方法。 【請求項9】 前記プロモーターが、構成的プロモーターである、請求項8に記載の方法。 【請求項10】 前記プロモーターが、ユビキチンプロモーターである、請求項9に記載の方法。 【請求項11】 植物細胞において病原体耐性を増大するための方法であって、該方法は、病原体誘導性プロモーターに作動可能に連結された少なくとも1つのヌクレオチド配列で該植物細胞を形質転換する工程を包含し、該ヌクレオチド配列は、以下：

a) トウモロコシ複製タンパク質A大サブユニットに対応するアンチセンスヌクレオチド配列、および b) 植物の複製タンパク質A中サブユニットに対応するアンチセンスヌクレオチド配列、からなる群より選択される、方法。 【請求項12】 少なくとも1つのヌクレオチド配列がゲノム内に安定に組み込まれている形質転換された植物細胞であって、該ヌクレオチド配列は、植物細胞において発現を駆動する異種プロモーターに作動可能に連結され、ここで、該ヌクレオチド配列は、以下：

a) トウモロコシ複製タンパク質A (RPA) 大サブユニット

50

をコードするヌクレオチド配列； b) 植物の複製タンパク質A (RPA) 中サブユニットをコードするヌクレオチド配列； c) 配列番号1、配列番号3、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19または配列番号21に示されるヌクレオチド配列； d) a)、b) またはc) のヌクレオチド配列の少なくとも20の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列； e) a)、b) またはc) のヌクレオチド配列に対応するアンチセンスヌクレオチド配列； f) a)、b) またはc) のヌクレオチド配列にストリンジент条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列； および g) 請求項1に記載のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列、からなる群より選択される、形質転換された植物細胞。【請求項13】 少なくとも1つのヌクレオチド配列がゲノム内に安定に組み込まれている形質転換された植物であって、該ヌクレオチド配列は、植物細胞において発現を駆動する異種プロモーターに作動可能に連結され、ここで、該ヌクレオチド配列は、以下： a) トウモロコシ複製タンパク質A (RPA) 大サブユニットをコードするヌクレオチド配列； b) 植物の複製タンパク質A (RPA) 中サブユニットをコードするヌクレオチド配列； c) 配列番号1、配列番号3、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19または配列番号21に示されるヌクレオチド配列； d) a)、b) またはc) のヌクレオチド配列の少なくとも20の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列； e) a)、b) またはc) のヌクレオチド配列に対応するアンチセンスヌクレオチド配列； f) a)、b) またはc) のヌクレオチド配列にストリンジент条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列； および g) 請求項1に記載のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列、からなる群より選択される、形質転換された植物。【請求項14】 請求項13に記載の植物の種子。【請求項15】 前記植物が、単子葉植物である、請求項13に記載の植物。【請求項16】 前記単子葉植物が、トウモロコシ、コムギ、イネ、オオムギ、モロコシまたはライムギである、請求項15に記載の植物。【請求項17】 前記植物が、双子葉植物である、請求項13に記載の植物。【請求項18】 前記双子葉植物が、ダイズ、アブラナ、ヒマワリ、アルファルファまたはベニバナからなる群より選択される、請求項17に記載の植物。【請求項19】 請求項17に記載の植物の種子。【請求項20】 植物細胞においてDNA代謝を調節するための方法であって、該方法は、プロモーターに作動可能に連結された少なくとも1つのヌクレオチド配列で該植物細胞を形質転換する工程を包含し、ここで、該ヌクレオチド配列は、以下： a) トウモロコシ複製タンパク質A (RPA) 大サブユニットをコードするヌクレオチド配列； b) 植物の複製タンパク質A (

RPA) 中サブユニットをコードするヌクレオチド配列； c) 配列番号1、配列番号3、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19または配列番号21に示されるヌクレオチド配列； d) a)、b) またはc) のヌクレオチド配列の少なくとも20の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列； e) a)、b) またはc) のヌクレオチド配列に対応するアンチセンスヌクレオチド配列； f) a)、b) またはc) のヌクレオチド配列にストリンジент条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列； および g) 請求項1に記載のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列、からなる群より選択される、方法。【請求項21】 植物細胞において細胞周期に影響を与えるための方法であって、該方法は、プロモーターに作動可能に連結された少なくとも1つのヌクレオチド配列で該植物細胞を形質転換する工程を包含し、ここで、該ヌクレオチド配列は、以下： a) トウモロコシ複製タンパク質A (RPA) 大サブユニットをコードするヌクレオチド配列； b) 植物の複製タンパク質A (RPA) 中サブユニットをコードするヌクレオチド配列； c) 配列番号1、配列番号3、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19または配列番号21に示されるヌクレオチド配列； d) a)、b) またはc) のヌクレオチド配列の少なくとも20の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列； e) a)、b) またはc) のヌクレオチド配列に対応するアンチセンスヌクレオチド配列； f) a)、b) またはc) のヌクレオチド配列にストリンジент条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列； および g) 請求項1に記載のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列、からなる群より選択される、方法。【請求項22】 植物細胞において非特異的組換えを増強するための方法であって、該方法は、植物細胞において発現を駆動する異種プロモーターに作動可能に連結された少なくとも1つのヌクレオチド配列で該植物細胞を形質転換する工程を包含し、ここで、該ヌクレオチド配列は、配列番号1、配列番号3、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19または配列番号21に示されるヌクレオチド配列にストリンジент条件下でハイブリダイズする、方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】 (発明の分野) 本発明は、形質転換した植物および植物細胞における、植物の遺伝的な操作、特にDNA代謝の調節に関連する。【0002】

(発明の背景) 複製タンパク質A (RPA) は、真核生物細胞において多岐の過程に関して必要とされる、一本鎖DNA結合タンパク質である。ヒト細胞由来のRPAは、70kDa、32kDa、および14kDaサブユニットの安定な複合体である。RPAの相合体は、調べられたすべての真核生物において同定された。しか

し、ヒトRPAおよび密接に関連した相同体だけは、SV40DNA複製を支持し得る。【0003】 RPA複合体は、すべての真核生物において高度に保存されているように見える。発芽酵母細胞における三つのRPA遺伝子は、細胞の生存性に必須である。それにもかかわらず、酵母RPAだけは、シミアンウイルス40のインビトロ複製においてヒトRPAを部分的に代用し、これは、RPAと他の複製タンパク質との間の種特異的な相互作用が、生物学的な活性に重要であり得ることを示す。【0004】 RPAは、ヘテロ三量体複合体であるかのように一本鎖DNAに強固に結合する。結合活性は、70kDaサブユニットに局在していた。二本鎖DNAおよびRNAの両方に対するRPAの親和性は、一本鎖DNAに対する親和性に比べて少なくとも3桁低い。RPAは、*S. cerevisiae*配列およびSV40複製起点の両方のピリミジンリッチな鎖に優先的に結合することが報告されている。しかし、*S. cerevisiae*における複製起点の決定を調べる研究は、この優先的な結合が、DNA複製の開始に対して重要ではないことを示す。【0005】 70kDa、32kDa、14kDaの範囲のRPAのサブユニットは、種々の供給源より同定された。32kDaサブユニットは、「RPA2」、「B」、「スモール (small)」、「32kDa」、「P32」、「P34」、および「ミドル (middle)」サブユニットとしても呼ばれている。本発明の目的において、「ミドル」サブユニットは、約32kDaの分子量を有するサブユニットを意図する。【0006】 RPAの中サブユニットは、以下においてある役割を有する：細胞周期調節；一本鎖DNA結合；DNA結合の親和性；DNA結合の種特異性；DNA組換え、修復、複製、および代謝；ならびにDNA損傷の応答 (Anderson (1966) Calif. Inst. Technol. ; Sero ussiら (1993) J. Biol. Chem. 268:7147-54; Kennyら (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:9757-61; Brushら (1995) Methods Enzymol. 262:522-48; Stiggerら (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:579-83; Philipov aら (1996) Genes Dev. 10:2222-33)。【0007】 多くの研究が、それによりDNA合成の細胞周期調節が達成される生化学的および遺伝的機構の探索を主な対象とした。細胞周期タンパク質の存在の描写における進歩が存在する一方、DNA複製の作用の機序についてのより多くの情報が必要である。さらに、細胞周期の調節または変更に関する方法が必要である。【0008】 (関連文献) Braunら (1997) Biochemistry 36:8443-8454; report on the rol

e of protein-protein interactions and function of replication protein A. It is reported that RPA modulates the activity of DNA polymerase α by multiple mechanisms. Looら (1997) Nucleic Acids Research 25:5041-5046 report on the identification of DNA replication in cell cycle proteins that interact with proliferation cell nuclear antigen. Longheseら (1994) Molecular and Cellular Biology 14:7884-7890 report that replication factor A is required for in vivo DNA replication, repair, and recombination. Stiggerら (1998) J. Biol. Chem. 273:9337-9343 provide a functional analysis of human replication protein A in nucleotide excision repair. Abremovaら (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:7186-7191 report that the interaction between replication protein A and p53 is disrupted after ultraviolet damage in a DNA repair-dependent manner. Newら (1998) Nature 391:407-410 reports that RAD52 protein stimulates DNA strand exchange by RAD51 and replication protein A. Stimulation was dependent on the concerted action of both RAD51 protein and RPA implying that specific protein-protein interactions between RAD52 protein, RAD51 protein and RPA are required. Duttaら (1992) EMBO J 11(6):2189-2199およびNiuら (1997) J. Biol. Chem. 272(19):12634-41 report cell cycle-dependent phosphorylation

n of the middle subunit of RPA, implying a role for the subunit in cell regulation. Bochkarevaら (1998) J. Biol. Chem. 273 (7):3932-3936 report the formation of a single stranded DNA binding site on the human RPA middle subunit. Masら (1998) Mol. Cell. Biol. 18 (11):6399-6407 report that the RPA middle subunit contacts nascent simian virus 40 DNA, particularly the early DNA chain intermediates synthesized by DNA polymerase alpha-primease (RNA-DNA primers), but not more advanced products. Lavrikら (1998) Nucleic Acids Res 26 (2):602-607 report on location of binding of individual subunits of human RPA to DNA primer-template complexes in various elongation reactions. Sibenallerら (1998) 37 (36):12496-12506 report that differences in the activity of the middle (32 kDa) and the small (14 kDa) subunits of RPA are responsible for variations in the single stranded DNA-binding properties of *Saccharomyces cerevisiae* and human RPA, thus implying a role for the subunits in species-specificity of DNA binding of RPA. (発明の要旨)

宿主細胞におけるDNA代謝を調節するための組成物および方法を、提供する。特に、トウモロコシ複製タンパク質A (RPA) のラージ (large) サブユニットおよび中サブユニットの相同体の完全なcDNA配列およびアミノ酸配列を、提供する。本発明の配列は、DNA複製、DNA修復および組換えを調節する工程において用途を見出す。【0009】 形質転換した植物は、変更された代謝状態を獲得し得る。本発明は、植物における遺伝的な形質転換および遺伝的なターゲティングにおける密接な関係を有する。さらに、この方法は、

特に誘導性または組織優先的な様式において、細胞死を促進するために用いられ得る。(発明の詳細な説明)
DNA代謝を調節するために有用なヌクレオチド配列およびタンパク質を、提供する。ヌクレオチドおよびアミノ酸配列は、トウモロコシの複製タンパク質A (RPA) サブユニットに相当する。RPAは、DNA複製、DNA修復、および組換えを含む、DNA代謝の多岐の過程に必要とされる一本鎖結合タンパク質である。RPA複合体は、約70, 32, 14 kDaのサブユニットを一般的に含む。用語「大サブユニット」「中サブユニット」および「スモールサブユニット」とは、本明細書において、個々に70 kDa、32 kDa、および14 kDaのおおよその分子量を有するRPAサブユニットを意図する。本発明の配列は、RPA複合体の大サブユニットおよび中サブユニットを含む。本発明の配列は、遺伝子発現の調節における用途をさらに見出す。【0010】 本発明の組成物は、DNA代謝の調節に関与するRPAヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を含む。特に、本発明は、配列番号2および4に記載の大サブユニットに対するアミノ酸配列、ならびに配列番号12、14、16、18、20および22に記載の中サブユニットに対するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子を提供する。配列番号2および配列番号4は、トウモロコシRPA大サブユニット相同体1 (ZmRPA LSH1) および相同体2 (ZmRPA LSH2) に対するアミノ酸配列に相当する。配列番号12、14、16、18、20、および22はそれぞれ、トウモロコシ中サブユニット相同体1 (ZmRPA MSH1) ; 相同体2および3 (ZmRPA MSH2およびZmRPA MSH3) ; 相同体4 (ZmRPA MSH4) ; 相同体5 (ZmRPA MSH5) ; 相同体6 (ZmRPA MSH6) ; および相同体7 (ZmRPA MSH7) のアミノ酸配列に対応する。【0011】 大サブユニットにおいて、本発明は、特許寄託番号98754および98843に記載の細菌宿主に挿入された、DNA配列をコードするヌクレオチド配列を代わりに提供する。大サブユニットにおいて、本明細書に記載の核酸分子によってコードされるアミノ酸配列を有するポリペプチド、例えば配列番号1および3に記載のポリペプチド、特許寄託番号98754および98843に記載の細菌宿主に挿入されたポリペプチド、ならびにこれらのポリペプチドのフラグメントまたは変異体を、さらに提供する。【0012】 本発明のRPA大サブユニットヌクレオチド配列を含むプラスミドは、American Type Culture Collection (ATCC)、Manassas, Virginiaの特許寄託に寄託され、特許寄託番号98754および98843を割り当てられた。これらの寄託物は、「特許手続き上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約」の条件で維持される。これらの

寄託は、単に当業者のための便宜として作製され、そして寄託が米国特許法第112条において要求される承認ではない。【0013】 トウモロコシRPAサブユニット相同体1 (ZmRPA LSH1) および相同体2 (ZmRPA LSH2) のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列は、配列番号1および3に記載される。トウモロコシRPA中サブユニット相同体1 (ZmRPA MSH1) ; 相同体2および3 (ZmRPA MSH2およびZmRPA MSH3) ; 相同体4 (ZmRPA MSH4) ; 相同体5 (ZmRPA MSH5) ; 相同体6 (ZmRPA MSH6) ; および相同体7 (ZmRPA MSH7) のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列は、それぞれ配列番号11、13、15、17、19および21に記載される。【0014】 本発明は、単離され、または実質的に精製された核酸またはタンパク質組成物を包含する。「単離された」または「精製された」核酸分子またはタンパク質、あるいはそれらの生物学的な活性部位は、組換え技術によって産生される場合、他の細胞性成分、または培養培地を実質的に含まず、あるいは化学的に合成される場合は、化学的前駆体または他の化学物質を実質的に含まない。好ましくは、「単離された」核酸は、核酸が由来する器官のゲノムDNAにおける核酸に天然に隣接する(すなわち、核酸の5'または3'末端に局在する配列)配列(好ましくはタンパク質コード化配列)を含まない。例えば、種々の実施態様において、単離された核酸分子は、核酸が由来する細胞のゲノムDNAにおいて核酸分子が天然に隣接する約5 kb、4 kb、3 kb、2 kb、1 kb、0.5 kb、または0.1 kb未満の核酸配列を含み得る。細胞性物質を実質的に含まないタンパク質は、混入するタンパク質の(乾燥重量により)約30%、20%、10%、または5%未満を有するタンパク質標品を含む。本発明のタンパク質またはその生物学的な活性部位を組換え的に産生する場合、好ましくは培養培地は、化学的前駆体または非タンパク質性の所望の化学物質の(乾燥重量により)約30%、20%、10%、または5%未満を示す。【0015】 RPAは、一本鎖DNA (ssDNA) に強固に結合する。二本鎖DNA (dsDNA) に対する結合親和性は、ssDNAに対する結合親和性より3~4桁低い。RPAは、転写の調節に関与すると考えられるある種のdsDNA配列に特異的に結合することが発見されているので、遺伝子発現の調節は、宿主細胞におけるRPA発現の増加または減少によって影響され得る。【0016】 RPAは、広い範囲の活性を有し、それゆえDNA代謝および細胞周期に関する用途を有する。RPAは、ヌクレオチド切除修復に必要とされるいくつかのタンパク質と特に相互作用する。修復タンパク質との相互作用は、RPAが、効率的な損傷認識および切断の目的に重要であり得ることを示す。RPAは、dsDNAの破損修復に重要である

タンパク質、RAD52タンパク質とさらに相互作用する。この相互作用は、相同体組換えに必須であるように見える。この様式において、本発明のヌクレオチドの発現は、組換えを引き起こすのに重要である因子を補充することによって、相同組換えを促進し得る。従って、本発明の方法および組成物は、相同組換えを促進する工程における用途を見出す。【0017】 一つの実施態様において、相同組換えによる遺伝的操作は、形質転換中の本発明のRPAコード化配列の発現、またはRPAタンパク質の供給のいずれかによって改善され得る。例えば、RPAタンパク質は、微粒子銃中の粒子へのコーティングとして供給され得る。あるいは、RPAの発現の目的に供給されるDNA構築物は、形質転換されるDNAに含まれ得る。形質転換中のRPAの増加、特に相同組換えによるポリヌクレオチドの組み込みは、所望のDNA配列の植物ゲノム中への統合および挿入を促進する。【0018】 同様の方法において、非特異的な組換え現象を促進するために、RPAタンパク質の発現または存在を抑制することは有益であり得る。この様式において、抗体、ペプチド、アンチセンスオリゴヌクレオチドなどは、RPAの活性を阻害するために利用され得る。あるいは、アンチセンス構築物は、RPAの発現の阻害および非特異的な組換えの促進を提供し得る。

【0019】 触媒的なRNA分子、すなわちリボザイムもまた、植物遺伝子の発現を阻害するために使用され得る。実質的に任意の標的RNAと特異的に対合し、そして特定の部位でホスホジエステル骨格を切断して、それによってその標的RNAを機能的に不活化するリボザイムを設計することが可能である。この切断の実行において、リボザイムはそれ自身を変化させず、他の分子を再利用および切断し得ることから、リボザイムは真の酵素である。アンチセンスRNA中のリボザイム配列の内包は、それらに対してRNA切断活性を与え、それによってその構築物の活性を増加させる。標的RNA特異的リボザイムの設計および使用は、Haseloffら、Nature (1988) 334:585-591に記載される。【0020】 本発明のポリヌクレオチド上の付属基として、種々の架橋剤、アルキル化剤およびラジカル生成種が、核酸を結合、標識、検出、および/または切断するために用いられ得る。例えば、Vlasov, V. V. ら(1986) Nucleic Acids Res. 14:4065-4076は、標的配列に相補的なヌクレオチドのアルキル化誘導体と一本鎖DNAフラグメントとの共有結合を記載する。同じグループによる同様の研究の報告は、Knorreら(1985) Biochimie 67:785-789による研究である。IversonおよびDervanはまた、切断を活性化し得る改変型ヌクレオチドの取込みによって媒介される一本鎖DNAの配列特異的切断を示した(1987) J. Am. Chem. Soc. 109

: 1241-1243)。Meyerら(1989) J. Am. Chem. Soc. 111: 8517-8519は、一本鎖標的ヌクレオチド配列に相補的なアルキル化剤を用いて標的ヌクレオチドへの共有結合架橋を達成する。ソラレンによって媒介される一本鎖オリゴヌクレオチドへの光活性化架橋は、Leeら(1988) Biochem. 27: 3197-3203に開示される。三重らせん形成プローブにおける架橋の使用はまた、Horneら(1990) J. Am. Chem. Soc. 112: 2435-2437によって開示された。一本鎖オリゴヌクレオチドの架橋のためのアルキル化剤としてのN4, N4-エタノシトシンの使用もまた、Webbら(1986) J. Am. Chem. Soc. 108: 2764-2765; Webbら(1986) Nucleic Acids Res. 14: 7661-7674; Feteritzら(1991) J. Am. Chem. Soc. 113: 4000において記載された。核酸を結合、検出、標識、および/または切断するための種々の化合物は、当該分野で公知である(例えば、米国特許第5,543,507号; 同第5,672,593号; 同第5,484,908号, 同第5,256,648号および同第5,681,941号を参照のこと。

【0021】RAPは、染色体DNAの複製に必要とされる。内因性RAP発現の阻害は、細胞、生物、または植物にとって有害である。従って、本発明の構築物を用いて、標的細胞または組織を選択的に殺し得る。このことは、誘導性プロモーターまたは組織に好ましいプロモーターの使用を通じて達成され得る。この様式では、本発明の配列は、病原体耐性の増強における用途を見出し得る。RAPコード配列に対するアンチセンス構築物は、病原体誘導プロモーターに作動可能に連結される。病原体との接触の際に、RAPアンチセンス構築物が発現されて、結果として細胞死を起こし、そして病原体の侵襲の効率的に予防する。【0022】本発明は、植物ペストに対する植物の耐性を誘導するための組成物および方法に引きつけられる。従って、この組成物および方法はまた、真菌病原体、ウイルス、線形動物、昆虫などに対して植物を保護するのに有用である。【0023】「疾患耐性」とは、植物が、植物病原体相互作用の結果である疾患症状を回避することを意図する。すなわち、病原体は、植物疾患症状または植物関連疾患症状を引き起こすことを妨げられるか、あるいは溶原体により引き起こされる疾患症状が、最小限にされるか、または減少される。本発明の方法を利用して、疾患から植物を保護し得る。特に、これらの疾患は、植物病原体により引き起こされる。【0024】本発明の病原体は、ウイルス、ウイロイド、細菌、昆虫、線形動物、真菌などを含むが、これらに限定されない。ウイルスとしては、例えば、タバコモザイクウイルスまたはキュウリモザイクウイルス、リングスポット(ringspot 50

)ウイルス、壊死ウイルス、トウモロコシドワーフ(dwarf)ウイルスなどの任意のウイルスが挙げられる。主な作物に特異的な真菌病原体およびウイルス病原体としては、以下が挙げられる: 【0025】【化1】

FIG: Phytophthora megasperma f.sp. glycinae, Macrophomina phaseolina, Rhizoctonia solani, Sclerotinia sclerotiorum, Fusarium oxysporum, Diaporthe phaseolorum var. sojae (Phaeogenes sojae), Diaporthe phaseolorum var. caulivora, Sclerotium rolfsii, Cercospora blighti, Cercospora asfina, Peronospora manshurica, Colletotrichum dematium (Colletotrichum truncatum), Corynespora cassiicola, Septoria glycines, Phyllosticta sojaecola, Alternaria alternata, Pseudomonas syringae p.v. glycines, Xanthomonas campestris p.v. phaseoli, Myrothecium albidum, Fusarium solani, Phialophora gregata, 1' 12' 13' 14' 15' 16' 17' 18' 19' 20' 21' 22' 23' 24' 25' 26' 27' 28' 29' 30' 31' 32' 33' 34' 35' 36' 37' 38' 39' 40' 41' 42' 43' 44' 45' 46' 47' 48' 49' 50' 51' 52' 53' 54' 55' 56' 57' 58' 59' 60' 61' 62' 63' 64' 65' 66' 67' 68' 69' 70' 71' 72' 73' 74' 75' 76' 77' 78' 79' 80' 81' 82' 83' 84' 85' 86' 87' 88' 89' 90' 91' 92' 93' 94' 95' 96' 97' 98' 99' 100' 101' 102' 103' 104' 105' 106' 107' 108' 109' 110' 111' 112' 113' 114' 115' 116' 117' 118' 119' 120' 121' 122' 123' 124' 125' 126' 127' 128' 129' 130' 131' 132' 133' 134' 135' 136' 137' 138' 139' 140' 141' 142' 143' 144' 145' 146' 147' 148' 149' 150' 151' 152' 153' 154' 155' 156' 157' 158' 159' 160' 161' 162' 163' 164' 165' 166' 167' 168' 169' 170' 171' 172' 173' 174' 175' 176' 177' 178' 179' 180' 181' 182' 183' 184' 185' 186' 187' 188' 189' 190' 191' 192' 193' 194' 195' 196' 197' 198' 199' 200' 201' 202' 203' 204' 205' 206' 207' 208' 209' 210' 211' 212' 213' 214' 215' 216' 217' 218' 219' 220' 221' 222' 223' 224' 225' 226' 227' 228' 229' 230' 231' 232' 233' 234' 235' 236' 237' 238' 239' 240' 241' 242' 243' 244' 245' 246' 247' 248' 249' 250' 251' 252' 253' 254' 255' 256' 257' 258' 259' 260' 261' 262' 263' 264' 265' 266' 267' 268' 269' 270' 271' 272' 273' 274' 275' 276' 277' 278' 279' 280' 281' 282' 283' 284' 285' 286' 287' 288' 289' 290' 291' 292' 293' 294' 295' 296' 297' 298' 299' 300' 301' 302' 303' 304' 305' 306' 307' 308' 309' 310' 311' 312' 313' 314' 315' 316' 317' 318' 319' 320' 321' 322' 323' 324' 325' 326' 327' 328' 329' 330' 331' 332' 333' 334' 335' 336' 337' 338' 339' 340' 341' 342' 343' 344' 345' 346' 347' 348' 349' 350' 351' 352' 353' 354' 355' 356' 357' 358' 359' 360' 361' 362' 363' 364' 365' 366' 367' 368' 369' 370' 371' 372' 373' 374' 375' 376' 377' 378' 379' 380' 381' 382' 383' 384' 385' 386' 387' 388' 389' 390' 391' 392' 393' 394' 395' 396' 397' 398' 399' 400' 401' 402' 403' 404' 405' 406' 407' 408' 409' 410' 411' 412' 413' 414' 415' 416' 417' 418' 419' 420' 421' 422' 423' 424' 425' 426' 427' 428' 429' 430' 431' 432' 433' 434' 435' 436' 437' 438' 439' 440' 441' 442' 443' 444' 445' 446' 447' 448' 449' 450' 451' 452' 453' 454' 455' 456' 457' 458' 459' 460' 461' 462' 463' 464' 465' 466' 467' 468' 469' 470' 471' 472' 473' 474' 475' 476' 477' 478' 479' 480' 481' 482' 483' 484' 485' 486' 487' 488' 489' 490' 491' 492' 493' 494' 495' 496' 497' 498' 499' 500' 501' 502' 503' 504' 505' 506' 507' 508' 509' 510' 511' 512' 513' 514' 515' 516' 517' 518' 519' 520' 521' 522' 523' 524' 525' 526' 527' 528' 529' 530' 531' 532' 533' 534' 535' 536' 537' 538' 539' 540' 541' 542' 543' 544' 545' 546' 547' 548' 549' 550' 551' 552' 553' 554' 555' 556' 557' 558' 559' 560' 561' 562' 563' 564' 565' 566' 567' 568' 569' 570' 571' 572' 573' 574' 575' 576' 577' 578' 579' 580' 581' 582' 583' 584' 585' 586' 587' 588' 589' 590' 591' 592' 593' 594' 595' 596' 597' 598' 599' 600' 601' 602' 603' 604' 605' 606' 607' 608' 609' 610' 611' 612' 613' 614' 615' 616' 617' 618' 619' 620' 621' 622' 623' 624' 625' 626' 627' 628' 629' 630' 631' 632' 633' 634' 635' 636' 637' 638' 639' 640' 641' 642' 643' 644' 645' 646' 647' 648' 649' 650' 651' 652' 653' 654' 655' 656' 657' 658' 659' 660' 661' 662' 663' 664' 665' 666' 667' 668' 669' 670' 671' 672' 673' 674' 675' 676' 677' 678' 679' 680' 681' 682' 683' 684' 685' 686' 687' 688' 689' 690' 691' 692' 693' 694' 695' 696' 697' 698' 699' 700' 701' 702' 703' 704' 705' 706' 707' 708' 709' 710' 711' 712' 713' 714' 715' 716' 717' 718' 719' 720' 721' 722' 723' 724' 725' 726' 727' 728' 729' 730' 731' 732' 733' 734' 735' 736' 737' 738' 739' 740' 741' 742' 743' 744' 745' 746' 747' 748' 749' 750' 751' 752' 753' 754' 755' 756' 757' 758' 759' 760' 761' 762' 763' 764' 765' 766' 767' 768' 769' 770' 771' 772' 773' 774' 775' 776' 777' 778' 779' 780' 781' 782' 783' 784' 785' 786' 787' 788' 789' 790' 791' 792' 793' 794' 795' 796' 797' 798' 799' 800' 801' 802' 803' 804' 805' 806' 807' 808' 809' 810' 811' 812' 813' 814' 815' 816' 817' 818' 819' 820' 821' 822' 823' 824' 825' 826' 827' 828' 829' 830' 831' 832' 833' 834' 835' 836' 837' 838' 839' 840' 841' 842' 843' 844' 845' 846' 847' 848' 849' 850' 851' 852' 853' 854' 855' 856' 857' 858' 859' 860' 861' 862' 863' 864' 865' 866' 867' 868' 869' 870' 871' 872' 873' 874' 875' 876' 877' 878' 879' 880' 881' 882' 883' 884' 885' 886' 887' 888' 889' 890' 891' 892' 893' 894' 895' 896' 897' 898' 899' 900' 901' 902' 903' 904' 905' 906' 907' 908' 909' 910' 911' 912' 913' 914' 915' 916' 917' 918' 919' 920' 921' 922' 923' 924' 925' 926' 927' 928' 929' 930' 931' 932' 933' 934' 935' 936' 937' 938' 939' 940' 941' 942' 943' 944' 945' 946' 947' 948' 949' 950' 951' 952' 953' 954' 955' 956' 957' 958' 959' 960' 961' 962' 963' 964' 965' 966' 967' 968' 969' 970' 971' 972' 973' 974' 975' 976' 977' 978' 979' 980' 981' 982' 983' 984' 985' 986' 987' 988' 989' 990' 991' 992' 993' 994' 995' 996' 997' 998' 999' 1000' 1001' 1002' 1003' 1004' 1005' 1006' 1007' 1008' 1009' 1010' 1011' 1012' 1013' 1014' 1015' 1016' 1017' 1018' 1019' 1020' 1021' 1022' 1023' 1024' 1025' 1026' 1027' 1028' 1029' 1030' 1031' 1032' 1033' 1034' 1035' 1036' 1037' 1038' 1039' 1040' 1041' 1042' 1043' 1044' 1045' 1046' 1047' 1048' 1049' 1050' 1051' 1052' 1053' 1054' 1055' 1056' 1057' 1058' 1059' 1060' 1061' 1062' 1063' 1064' 1065' 1066' 1067' 1068' 1069' 1070' 1071' 1072' 1073' 1074' 1075' 1076' 1077' 1078' 1079' 1080' 1081' 1082' 1083' 1084' 1085' 1086' 1087' 1088' 1089' 1090' 1091' 1092' 1093' 1094' 1095' 1096' 1097' 1098' 1099' 1100' 1101' 1102' 1103' 1104' 1105' 1106' 1107' 1108' 1109' 1110' 1111' 1112' 1113' 1114' 1115' 1116' 1117' 1118' 1119' 1120' 1121' 1122' 1123' 1124' 1125' 1126' 1127' 1128' 1129' 1130' 1131' 1132' 1133' 1134' 1135' 1136' 1137' 1138' 1139' 1140' 1141' 1142' 1143' 1144' 1145' 1146' 1147' 1148' 1149' 1150' 1151' 1152' 1153' 1154' 1155' 1156' 1157' 1158' 1159' 1160' 1161' 1162' 1163' 1164' 1165' 1166' 1167' 1168' 1169' 1170' 1171' 1172' 1173' 1174' 1175' 1176' 1177' 1178' 1179' 1180' 1181' 1182' 1183' 1184' 1185' 1186' 1187' 1188' 1189' 1190' 1191' 1192' 1193' 1194' 1195' 1196' 1197' 1198' 1199' 1200' 1201' 1202' 1203' 1204' 1205' 1206' 1207' 1208' 1209' 1210' 1211' 1212' 1213' 1214' 1215' 1216' 1217' 1218' 1219' 1220' 1221' 1222' 1223' 1224' 1225' 1226' 1227' 1228' 1229' 1230' 1231' 1232' 1233' 1234' 1235' 1236' 1237' 1238' 1239' 1240' 1241' 1242' 1243' 1244' 1245' 1246' 1247' 1248' 1249' 1250' 1251' 1252' 1253' 1254' 1255' 1256' 1257' 1258' 1259' 1260' 1261' 1262' 1263' 1264' 1265' 1266' 1267' 1268' 1269' 1270' 1271' 1272' 1273' 1274' 1275' 1276' 1277' 1278' 1279' 1280' 1281' 1282' 1283' 1284' 1285' 1286' 1287' 1288' 1289' 1290' 1291' 1292' 1293' 1294' 1295' 1296' 1297' 1298' 1299' 1300' 1301' 1302' 1303' 1304' 1305' 1306' 1307' 1308' 1309' 1310' 1311' 1312' 1313' 1314' 1315' 1316' 1317' 1318' 1319' 1320' 1321' 1322' 1323' 1324' 1325' 1326' 1327' 1328' 1329' 1330' 1331' 1332' 1333' 1334' 1335' 1336' 1337' 1338' 1339' 1340' 1341' 1342' 1343' 1344' 1345' 1346' 1347' 1348' 1349' 1350' 1351' 1352' 1353' 1354' 1355' 1356' 1357' 1358' 1359' 1360' 1361' 1362' 1363' 1364' 1365' 1366' 1367' 1368' 1369' 1370' 1371' 1372' 1373' 1374' 1375' 1376' 1377' 1378' 1379' 1380' 1381' 1382' 1383' 1384' 1385' 1386' 1387' 1388' 1389' 1390' 1391' 1392' 1393' 1394' 1395' 1396' 1397' 1398' 1399' 1400' 1401' 1402' 1403' 1404' 1405' 1406' 1407' 1408' 1409' 1410' 1411' 1412' 1413' 1414' 1415' 1416' 1417' 1418' 1419' 1420' 1421' 1422' 1423' 1424' 1425' 1426' 1427' 1428' 1429' 1430' 1431' 1432' 1433' 1434' 1435' 1436' 1437' 1438' 1439' 1440' 1441' 1442' 1443' 1444' 1445' 1446' 1447' 1448' 1449' 1450' 1451' 1452' 1453' 1454' 1455' 1456' 1457' 1458' 1459' 1460' 1461' 1462' 1463' 1464' 1465' 1466' 1467' 1468' 1469' 1470' 1471' 1472' 1473' 1474' 1475' 1476' 1477' 1478' 1479' 1480' 1481' 1482' 1483' 1484' 1485' 1486' 1487' 1488' 1489' 1490' 1491' 1492' 1493' 1494' 1495' 1496' 1497' 1498' 1499' 1500' 1501' 1502' 1503' 1504' 1505' 1506' 1507' 1508' 1509' 1510' 1511' 1512' 1513' 1514' 1515' 1516' 1517' 1518' 1519' 1520' 1521' 1522' 1523' 1524' 1525' 1526' 1527' 1528' 1529' 1530' 1531' 1532' 1533' 1534' 1535' 1536' 1537' 1538' 1539' 1540' 1541' 1542' 1543' 1544' 1545' 1546' 1547' 1548' 1549' 1550' 1551' 1552' 1553' 1554' 1555' 1556' 1557' 1558' 1559' 1560' 1561' 1562' 1563' 1564' 1565' 1566' 1567' 1568' 1569' 1570' 1571' 1572' 1573' 1574' 1575' 1576' 1577' 1578' 1579' 1580' 1581' 1582' 1583' 1584' 1585' 1586' 1587' 1588' 1589' 1590' 1591' 1592' 1593' 1594' 1595' 1596' 1597' 1598' 1599' 1600' 1601' 1602' 1603' 1604' 1605' 1606' 1607' 1608' 1609' 1610' 1611' 1612' 1613' 1614' 1615' 1616' 1617' 1618' 1619' 1620' 1621' 1622' 1623' 1624' 1625' 1626' 1627' 1628' 1629' 1630' 1631' 1632' 1633' 1634' 1635' 1636' 1637' 1638' 1639' 1640' 1641' 1642' 1643' 1644' 1645' 1646' 1647' 1648' 1649' 1650' 1651' 1652' 1653' 1654' 1655' 1656' 1657' 1658' 1659' 1660' 1661' 1662' 1663' 1664' 1665' 1666' 1667' 1668' 1669' 1670' 1671' 1672' 1673' 1674' 1675' 1676' 1677' 1678' 1679' 1680' 1681' 1682' 1683' 1684' 1685' 1686' 1687' 1688' 1689' 1690' 1691' 1692' 1693' 1694' 1695' 1696' 1697' 1698' 1699' 1700' 1701' 1702' 1703' 1704' 1705' 1706' 1707' 1708' 1709' 1710' 1711' 1712' 1713' 1714' 1715' 1716' 1717' 1718' 1719' 1720' 1721' 1722' 1723' 1724' 1725' 1726' 1727' 1728' 1729' 1730' 1731' 1732' 1733' 1734' 1735' 1736' 1737' 1738' 1739' 1740' 1741' 1742' 1743' 1744' 1745' 1746' 1747' 1748' 1749' 1750' 1751' 1752' 1753' 1754' 1755' 1756' 1757' 1758' 1759' 1760' 1761' 1762' 1763' 1764' 1765' 1766' 1767' 1768' 1769' 1770' 1771' 1772' 1773' 1774' 1775' 1776' 1777' 1778' 1779' 1780' 1781' 1782' 1783' 1784' 1785' 1786' 1787' 1788' 1789' 1790' 1791' 1792' 1793' 1794' 1795' 1796' 1797' 1798' 1799' 1800' 1801' 1802' 1803' 1804' 1805' 1806' 1807' 1808' 1809' 1810' 1811' 1812' 1813' 1814' 1815' 1816' 1817' 1818' 1819' 1820' 1821' 1822' 1823' 1824' 1825' 1826' 1827' 1828' 1829' 1830' 1831' 1832' 1833' 1834' 1835' 1836' 1837' 1838' 1839' 1840' 1841' 1842' 1843' 1844' 1845' 1846' 1847' 1848' 1849' 1850' 1851' 1852' 1853' 1854' 1855' 1856' 1857' 1858' 1859' 1860' 1861' 1862' 1863' 1864' 1865' 1866' 1867' 1868' 1869' 1870' 1871' 1872' 1873' 1874' 1875' 1876' 1877' 1878' 1879' 1880' 1881' 1882' 1883' 1884' 1885' 1886' 1887' 1888' 1889' 1890' 1891' 1892' 1893' 1894' 1895' 1896' 1897' 1898' 1899' 1900' 1901' 1902' 1903' 1904' 1905' 1906' 1907' 1908' 1909' 1910' 1911' 1912' 1913' 1914' 1915' 1916' 1917' 1918' 1919' 1920' 1921' 1922' 1923' 1924' 1925' 1926' 1927' 1928' 1929' 1930' 1931' 1932' 1933' 1934' 1935' 1936' 1937' 1938' 1939' 1940' 1941' 1942' 1943' 1944' 1945' 1946' 1947' 1948' 1949' 1950' 1951' 1952' 1953' 1954' 1955' 1956' 1957' 1958' 1959' 1960' 1961' 1962' 1963' 1964' 1965' 1966' 1967' 1968' 1969' 1970' 1971' 1972' 1973' 1974' 1975' 1976' 1977' 1978' 1979' 1980' 1981' 1982' 1983' 1984' 1985' 1986' 1987' 1988' 1989' 1990' 1991' 1992' 1993' 1994' 1995' 1996' 1997' 1998' 1999' 2000' 2001' 2002' 2003' 2004' 2005' 2006' 2007' 2008' 2009' 2010' 2011' 2012' 2013' 2014' 2015' 2016' 2017' 2018' 2019' 2020' 2021' 2022' 2023' 2024' 2025' 2026' 2027' 2028' 2029'

(1977)

[illegible]

根瘤、シスト、および病巢の線形動物のような、寄生性線形動物を含む線形動物としては、以下が挙げられる：
【0026】 【化2】

Heterodera 及 *Globodera* spp. 以下 *Globodera*
rauschkei 及 *globodera pallida* (1-11 種) 植物動物); *Heterodera glycines*
 (1-11 種) 植物動物); *Heterodera schachtii* (1-11 種) 植物動物); 以下
Heterodera avenae (植物動物)

昆虫ペストとしては、以下の目から選択される昆虫が
挙げられる： 【0027】 【化3】

Coleoptera, Diptera,
 Hymenoptera, Lepidoptera, Mallophaga, Homoptera, Hemiptera, Orthoptera,
 Thysanoptera, Dermaptera, Isoptera, Anophora, Siphonaptera, Trichoptera, etc.
 48c. Coleoptera 24/Lepidoptera.

主な作物についての本発明の昆虫ペストとしては、以下が挙げられる：トウモロコシ；*Ostrinia nubilalis*、アワノメイガ；*Agrotis ipsilon*、クロネキリムシ（black cutworm）；*Helicoverpa zea*、オオタバコガ；*Spodoptera frugiperda*、シロヤナガ；*Diatraea grandiosella*、トウモロコシノメイガ；*Elasmopalpus lignosellus*、マダラメイガ；*Diatraea saccharalis*、サトウキビボーラー（sugarcane borer）；*Diabrotica virgifera*、西部ハムシモドキ（we 50

stem corn rootworm) ; Diabrotica longicornis barberi、北部ハムシモドキ (northern corn rootworm) ; Diabrotica undecimpunctata howardi、南部ハムシモドキ (southern corn rootworm) ; Melanotus spp.、コメツキムシ (幼虫) (wireworms) ; Cyclocephala borealis、北部マスクコガネムシ (northern masked chafer) (シロジムシ) ; Cyclocephala immaculata、南部マスクコガネムシ (southern masked chafer) (シロジムシ) ; Popillia japonica、マメコガネ ; Chaetocnema pulicaria、トウモロコシノミハムシ ; Sphenophorus maidis、トウモロコシゾウムシ ; Rhopalosiphum maidis、トウモロコシアブラムシ ; Anuraphis maidiradicis、トウモロコシハムシ ; Blissus leucopterus leucopterus、ナンキンムシ ; Melanoplus femurrubrum、アカアシバッタ (red legged grasshopper) ; Melanoplus sanguinipes、渡りバッタ (migratory grasshopper) ; Hylemya platura、タネトウモロコシマゴツト (seed corn maggot) ; Agromyza parvicornis、コーンブロットリーフマイナー (corn biot leafminer) ; Anaphothrips obscurus、イネアザミ (grass thrips) ; Solenopsis milesta、トウゾクアリ ; Tetranychus urticae、ナミハダニ ; サトウモロコシ : Chilo partellus、サトウモロコシボラー ; Spodoptera frugiperda、シロヤナガ ; Helicoverpa zea、オオタバコガ ; Elasmopalpus lignosellus、マダラメイガ ; Feltia subterranea、グラニユレートカットワーム (granulate cutworm) ; Phyllophaga crinita、シロジムシ ; Eleodes, Conederus、ならびに Aeolus spp.、コメツキムシ (幼虫) ; Oulema melanopus、クビボソハムシ ; Chaetocnema pulicaria、トウモロコシハムシ ; Sphenophorus maidis、トウモロコシゾウムシ ; Rhopalosiphum maidis ; トウモロコシアブラムシ ; Siphia flava、キサトウキビアブラムシ (yellow sugarcane aphid) ; Blissus leucopterus l

eucopterus、ナンキンムシ; Contarinia sorghicola、サトウモロコシミジ (midge); Tetranychus cinnabarinus、カーミンハダニ (carmine spider mite); Tetranychus urticae、ナミハダニ; コムギ: Pseudaletia unipunctata、ヨトウムシ; Spodoptera frugiperda、シロヤナガ; Elasmopalpus lignosellus、マダラメイガ; Agrotis orthogonia、西部ヨトウムシ (western cutworm); Elasmopalpus lignosellus、マダラメイガ; Oulema melanopus、クビボソハムシ; Hypera punctata、クローバーゾウムシ (clover leaf weevil); Diabrotica undecimpunctata howardi、南部ハムシモドキ; ロシアコムギアブラムシ (Russian wheat aphid); Schizaphis graminum、ミドリアブラムシ (greenbug); Macrosiphum avenae、イングリッシュグレインアブラムシ (English grain aphid); Melanoplus femurrubrum、アカアシバツタ、Melanoplus differentialis、ディファレンシャルグラスホッパー (differential grasshopper); Melanoplus sanguinipes、渡りバツタ; Mayetiola destructor、コムギタマバエ; Sitodiplosis moellana、コムギミジ; Meromyza americana、コムギ茎マゴツト (wheat stem maggot); Hylemya coarctata、コムギハナアブ; Frankliniella fusca、タバコアザミウマ; Cephus cinctus、コムギ茎ハバチ (wheat stem sawfly); Aceria tulipae、コムギカールダニ (wheat curl mite); ヒマワリ: Suleima helianthana、ヒマワリバドモス (sunflower bud moth); Homoeosoma electellum、ヒマワリガ (sunflower moth); zygogramma exclamatoris、サンフラワービートル (sunflower beetle); Bothyrus gibbosus、ニンジンビートル (carrot beetle); Neolasioptera murtfeldtiana、ヒマワリタネミジ (sunflower seed midge); 綿: Heliothis virescens、綿バドワーム (cotton budworm); Helicoverpa zea、綿ホールワーム (cotton

bollworm); Spodoptera exigua、ビートヨトウムシ; Pectinophora gossypiella、ピンクボウルワーム (pink bollworm); Anthonomus grandis grandis、ボウルゾウムシ (boll weevil); Aphis gossypii、ワタアブラムシ; Pseudatomoscelis seriatus、ワタノミハムシ; Trialeurodes abutilonea、バンデットウィングドホワイトフライ (banded winged whitefly); Lygus lineolaris、ミドリメクラガメ; Melanoplus femurrubrum、アカアシバツタ; Melanoplus differentialis、ディファレンシャルグラスホッパー; Thrips tabaci、タマネギアザミウマ; Frankliniella fusca、タバコアザミウマ; Tetranychus cinnabarinus、カーミンハダニ; Tetranychus urticae、ナミハダニ; コメ: Diatraea saccharalis、サトウキビボーラー; Spodoptera frugiperda、シロヤナガ; Helicoverpa zea、オオタバコガ; Colaspis brunnea、ブドウコラスピス (grape colaspis); Lissorhoptrus oryophilus、コメミズコクゾウムシ (rice water weevil); Sitophilus oryzae、コクゾウ; Nephotettix nigropictus、コメリーフホッパー (rice leaf hopper); Blissus leucopterus leucopterus、ナンキンムシ; Acrosternum hilare、グリーンステインクバグ (green stink bug); ダイズ: Pseudoplusia includens、ダイズシャクトリムシ (looper); Anticarsia gemmatilis、ベルベツトビーンキャタピラー (velvet bean caterpillar); Plathypena scabra、グリーンクローバーワーム (green cloverworm); Ostrinia nubilalis、アワノメイガ; Agrotis ipsilon、クロネキリムシ; Spodoptera exigua、ビートコメツキムシ (幼虫); Heliothis virescens、コットンバドワーム (cotton budworm); Helicoverpa zea、ワタボウルワーム; Epilachna varivestis、マダラテントウムシ; Myzus persicae、モモアカアブラムシ; Empoasca fabae、ジャガイモリーフホッパー; Acrosternum hilare、グリーンステインクバグ; Melano

plus femurrubrum、アカアシバツタ;
 Melanoplus differentialis、ディファレンシャルグラスホッパー;
 Hylemya platura、タネトウモロコシマゴツト;
 Sericothrips variabilis、ダイズアザミウマ;
 Thrips tabaci、タマネギアザミウマ;
 Tetranychus turkestanii、イチゴハダニ;
 Tetranychus urticae、ナミハダニ;
 オオムギ: Ostrinia nubilalis、アワノメイガ;
 Agrotis ipsilon、クロネキリムシ;
 Schizaphis graminum、ミドリアブラムシ;
 Blissus leucopterus leucopterus、ナンキンムシ;
 Acrosternum hilare、グリーンステINKバグ;
 Euschistus servus、ブラウンステINKバグ (brown stink bug);
 Delia platura、タネトウモロコシマゴツト;
 Mayetiola destructor、コムギタバエ;
 Petrobia latens、チャコムギダニ (brown wheat mite);
 セイヨウアブラナ (Oil Seed Rape);
 Brevicoryne brassicae、キャベツアブラムシ;
 Phyllotreta cruciferae、ノミハムシ;
 Mamestra configurata、バーサヨトウムシ (Bertha armyworm);
 Plutella xylostella、コナガ;
 Delia spp.、ルートマゴツト (Root maggots);

【0028】 多数のプロモーターが本発明の実施において使用され得る。これらのプロモーターは、所望の結果に基づいて選択され得る。核酸が、植物における発現のための構成的プロモーター、組織選択的プロモーター、または他のプロモーターと組み合わせられ得る。【0029】 再生植物のすべての組織において、本発明のポリヌクレオチドの発現を指向する植物プロモーターが利用され得る。このようなプロモーターは、本明細書で「構成的」プロモーターと称され、そして大部分の環境条件および発生または細胞分化の状態の下で活性である。このような構成的プロモーターには、例えば、Rsyn7のコアプロモーター (WO99/43838);
 CoaMV35Sプロモーター (Odellら (1985) Nature 313:810-812);
 イネアクチン (McElroyら (1990) Plant Cell 2:163-171);
 ユビキチン (Christensenら (1989) Plant Mol. Biol. 12:619-632およびChristensenら (1992) Plant Mol. Biol. 18:675-689);
 pEMU (Lastら (1991) Theor. Appl. Genet. 81:581-588);
 MAS (Veltenら (1984) EM

BO J. 3:2732-2730);
 ALSプロモーター (米国特許第5,659,026号)などが挙げられる。他の構成的プロモーターには、例えば、米国特許第5,608,149号;同第5,608,144号;同第5,604,121号;同第5,569,597号;同第5,466,785号;同第5,399,680号;同第5,268,463号;および同第5,608,142号が挙げられる。【0030】 あるいは、植物プロモーターは、特定組織において本発明のポリヌクレオチドの発現を指向し得るか、またはそうでなければ、より正確な環境制御下または発生制御下にあり得る。このようなプロモーターは、本明細書では、「誘導性」プロモーターと称する。誘導性プロモーターにより転写を行い得る環境条件は、病原体攻撃、嫌気条件、または光の存在を含む。誘導性プロモーターの例は、低酸素症または冷ストレスにより誘導性であるAdhIプロモーター、熱ストレスにより誘導性であるHsp70プロモーター、および光により誘導性であるPPDKプロモーターである。【0031】 発生制御下にあるプロモーターの例は、葉、根、果実、種子、または花のような特定組織においてのみ、または優先的に転写を開始するプロモーターを含む。例示的プロモーターは、薬特異的プロモーター5126 (米国特許第5,689,049号および同第5,689,051号)である。プロモーターの作用はまた、そのゲノムにおけるその位置に依存して変化し得る。従って、誘導性プロモーターは、特定の位置において完全にまたは部分的に構成的であり得る。【0032】 これらのプロモーターは、所望の結果に基づいて選択され得る。遺伝子が細胞死を引き起こすレベルで発現される場合、誘導性プロモーターまたは組織特異的プロモーターが、使用され、本発明の遺伝子の発現を駆動し得る。誘導性プロモーターは、不必要な細胞死を防ぐために厳重に制御されなければならないが、感染症状および疾患症状を防ぐために病原体の存在下で発現されなければならない。【0033】 一般的に、誘導性プロモーターから、特に病原体誘導性プロモーターから遺伝子を発現することは有益である。このようなプロモーターには、病原関連タンパク質 (PRタンパク質) 由来のものが挙げられ、これらは、以下の病原体による感染に続いて誘導される;例えば、PRタンパク質、SARタンパク質、 β -1,3-グルカナーゼ、キチナーゼなど。例えば、Redolfiら (1983) Neth. J. Plant Pathol. 89:245-254;Uknesら (1992) Plant Cell 4:645-6556;およびVan Loon (1985) Plant Mol. Virol. 4:111-116を参照のこと。「Inducible Maize Promoters」という表題の同時係属中の出願 (米国特許出願第09/257,583号、1999年2月25日出願) (本明細書中で参考

として援用される)もまた参照のこと。【0034】

病原体感染の部位またはその付近で局所的に発現されるプロモーターが重要である。例えば、Marineaら(1987) *Plant Mol. Biol.* 9: 353-342; Mattonら(1989) *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2: 325-331; Somsischら(1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 2427-2430; Somischら(1988) *Mol. Gen. Genet.* 2: 93-98; およびYang(1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 14972-14977を参照のこと。Chenら(1996) *Plant. J.* 10: 955-966; Zhangら(1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 2507-2511; Warnerら(1993) *Plant. J.* 3: 191-201; Siebertzら(1989) *Plant Cell*: 961-968; 米国特許第5, 750, 386号(線虫誘導性); およびそこに引用される参考文献もまた参照のこと。トウモロコシPRms遺伝子についての誘導性プロモーターが特に重要であり、これらの発現は、病原体Fusarium moniliformeによって誘導される(例えば、Corderoら(1992) *Physiol. Mol. Plant Path.* 41: 189-200を参照のこと)。

【0035】さらに、創傷または昆虫損傷によって植物への侵入が見出される病原体として、創傷誘導性プロモーターが、本発明の構成において使用され得る。このような創傷誘導性プロモーターには、ジャガイモプロテインゼインヒビター (pin 11) 遺伝子 (Ryan (1990) *Ann. Rev. Phytopath.* 28: 425-449; Duanら(1996) *Nature Biotechnology* 14: 494-498); wun1およびwun2、米国特許第5, 428, 148号; win1およびwin2 (Stanfordら(1989) *Mol. Gen. Genet.* 215: 200-208); システミン (systemin) (McGurlら(1992) *Science* 225: 1570-1573); WIP1 (Rohmeierら(1993) *Plant Mol. Biol.* 22: 783-792; Echelkampら(1993) *FEBS Letters* 323: 73-76); MPI遺伝子 (Corderoら(1994) *Plant. J.* 6 (2) 141-150など(これらは、本明細書中で参考として援用される)が挙げられる。【0036】

化学物質調節プロモーターは、外来の化学調節因子の適用によって、植物における遺伝子の発現を調節するために使用され得る。目的に依存して、プロモーターは、化学物質誘導性プロモーター(ここで、この化学物質の適用は遺伝

子発現を誘導する)であり得、または化学物質抑制性プロモーター(ここで、この化学物質の適用は、遺伝子の発現を抑制する)であり得る。化学誘導性プロモーターは、当該分野において公知であり、そして以下が挙げられるが、これらに限定されない: トウモロコシIn2-2プロモーター(これは、ベンゼンスルホンアミド除草剤安全剤(safener)によって活性化される)、トウモロコシGSTプロモーター(これは、出芽前(pre-emergent)除草剤として使用される疎水性求電子化合物によって活性化される)、およびタバコPR-1aプロモーター(これは、サリチル酸によって活性化される)。問題の他の化学物質調節プロモーターには、ステロイド応答性プロモーター(例えば、Schenaら(1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 10421-10425およびMcNellisら(1998) *Plant J.* 14 (2): 247-257におけるグルココルチコイド誘導性プロモーターを参照のこと)およびテトラサイクリン誘導性プロモーターおよびテトラサイクリン抑制性プロモーター(例えば、Gatzら(1991) *Mol. Gen. Genet.* 227: 229-237、および米国特許第5, 814, 618号および同第5, 789, 156号を参照のこと)が挙げられ、本明細書中で参考として援用される。

【0037】低レベルの発現が所望される場合、弱いプロモーターが使用される。一般的に、「弱いプロモーター」によって、低レベルでのコード配列の発現を駆動するプロモーターが意図される。低レベルによって、約1/1000転写物〜約1/100, 000転写物〜約1/500, 000転写物のレベルが意図される。あるいは、弱いプロモーターはまた、少数の細胞のみにおいて発現され、そして他で発現されず、全体的に低レベルの発現を与えるプロモーターを含む。プロモーターが、受容可能でない高いレベルで発現される場合、プロモーター配列の一部が、発現レベルを減少させるために欠失または改変され得る。

【0038】このような弱い構成的プロモーターには、例えば、Rsyn7のコアプロモーター(WO99/43838)、コア35SCaMVプロモーターなどが挙げられる。他の構成的プロモーターには、例えば、米国特許第5, 608, 149号; 同第5, 608, 144号; 同第5, 604, 121号; 同第5, 569, 597号; 同第5, 399, 680号; 同第5, 268, 463号; および同第5, 608, 142号が挙げられる。

「Constitutive Maize Peomoters」との表題の同時係属中の出願(米国特許出願第09/257, 584号、1999年2月25日出願)(これは、本明細書中で参考として援用される)もまた参照のこと。

【0039】組織選択的プロモーターは、特定の植物組織内の増強されたRPA発現を標的化するために利用され得る。本発明のこの局面におい

て、アンチセンス構築物は、組織選択的発現のために有用である。雄性または雌性不稔性は、組織に選択されるプロモーターと共にアンチセンス構築物を使用することによってもたらされ得る。制限的でないが、雄性不稔性についてのプロモーターが特に重要である。例えば、蒴選択的プロモーター5126が使用され得る。例えば、米国特許第5,689,049号および同第5,689,051号（これらは、本明細書中で参考として援用される）を参照のこと。【0040】組織選択的プロモーターには、以下が挙げられる：Yamamotoら（1997）*Plant. J.* 12（2）：255-265；Kawamataら（1997）*Plant Cell Physiol.* 38（7）：792-803；Hansenら（1997）*Mol. Gen. Genet.* 254（3）：337-343；Russellら（1997）*Transgenic Res.* 6（2）：157-168；Rinehartら（1996）*Plant Physiol.* 112（3）：1331-1341；Van Campら（1996）*Plant Physiol.* 112（2）：525-535；Canevasciniら（1996）*Plant Physiol.* 112（2）：513-524；Yamamotoら（1994）*Plant Cell Physiol.* 35（5）：773-778；Lam（1994）*Results Probl. Cell Differ.* 20：181-196；Orozcoら（1993）*Plant Mol. Biol.* 23（6）：1129-1138；Matsuokaら（1993）*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90（20）：9586-9590；およびGuevarra-Garciaら（1993）*Plant J.* 4（3）：495-505。このようなプロモーターは、必要であれば、弱い発現のために改変され得る。【0041】葉特異的プロモーターは、当該分野において公知であり、例えば、Yamamotoら（1997）*Plant J.* 12（2）：255-265；Kwonら（1994）*Plant Physiol.* 105：357-67；Yamamotoら（1994）*Plant Cell Physiol.* 35（5）：773-778；Gotorら（1993）*Plant. J.* 3：509-18；Orozcoら（1993）*Plant Mol. Biol.* 23（6）：1129-1138；およびMatsuokaら（1993）*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90（20）：9586-9590を参照のこと。【0042】根特異的プロモーターは公知であり、そして文献から利用可能な多くのものまたは種々の適合性種から新たに単離されるものから選択され得る。例えば、Hireら（1992）*Plant Mol. Biol.* 20（2）：207-218（ダイズ根特異的グルタミンシンテター

ゼ遺伝子）；KellerおよびBaumgartner（1991）*Plant Cell* 3（10）：1051-1061（French豆のGRP1.8遺伝子の根特異的制御エレメント）；Sangerら（1990）*Plant Mol. Biol.* 14（3）：433-443（*Agrobacterium tumefaciens*のマノピン（mannopine）シンターゼ（MAS）の根特異的プロモーター）；およびMiaoら（1991）*Plant Cell* 3（1）：11-22（サイトゾルのグルタミンシンテターゼ（GS）をコードする全長cDNAクローン、ダイズの根および根粒において発現される）を参照のこと。Boguszら（1990）*Plant Cell* 2（7）：633-641（ここで、窒素固定非マメ科植物*Parasponia andersonii*および関連の非窒素固定非マメ科植物*Trema tomentos*a由来のヘモグロブリン遺伝子から単離された2つの根特異的プロモーターが記載される）もまた参照のこと。これらの遺伝子のプロモーターは、 β -グロクロニダーゼレポーター遺伝子に結合され、そして非マメ科植物*Nicotiana tabacum*およびマメ科植物*Lotus corniculatus*の両方に導入され、そして両方の場合において、根特異的プロモーター活性が保存された。LeachおよびAoyagi（1991）は、*Agrobacterium rhizogenes*の高度に発現されたrolCおよびrolD根誘導性遺伝子のプロモーターのそれらの分析を記載する（*Plant Science (Limerick)* 79（1）：69-76を参照のこと）。彼らは、エンハンサーおよび組織選択的DNA決定因子は、それらのプロモーター中に分離されていると結論付けた。Teeriraら（1989）は、lacZへの遺伝子融合を使用して、オクトピンシンターゼをコードする*Agrobacterium T-DNA*遺伝子が、根端の表皮において特に活性であること、およびTR2'遺伝子は、インタクトな植物において根特異的であり、葉組織における損傷によって刺激されること（殺虫（insecticidal）遺伝子または殺虫（larvicidal）遺伝子と共の使用についての特に所望の特徴の組み合わせ）を示した（*EMBO J.* 8（2）：343-350を参照のこと）。nptII（ネオマイシンホスホトランスフェラーゼII）へ融合されたTR1'遺伝子は、同様の特徴を示した。さらなる根選択的プロモーターには、VfENOD-GRP3遺伝子プロモーター（Kusterら（1995）*Plant Mol. Biol.* 29（4）：759-772）；およびrolBプロモーター（Capanara（1994）*Plant Mol. Biol.* 25（4）：681-691）が挙げられる。米国特許第5,837,876号；同第5,750,386号；同第5,633,363号；同第5,

459, 252号; 同第5, 401, 836号; 同第5, 110, 732号; および同第5, 023, 179号もまた参照のこと。【0043】「種子選択的」プロモーターには、「種子特異的」プロモーター(種子貯蔵タンパク質のプロモーターのような種子発生の間に活性のプロモーター)ならびに「種子発芽」プロモーター(種子発芽の間に活性のプロモーター)の両方が挙げられる。Thompsonら(1989) BioEssays 10:108(これは、本明細書中で参考として援用される)を参照のこと。このような種子選択的プロモーターには、以下が挙げられるが、これらに限定されない: Cim1(サイトカニン誘導メッセージ); cZ19B(トウモロコシ19kDaゼイン); milps(ミオイノシトール-1-ホスフェートシンターゼ); および celA(セルロースシンターゼ) (「Seed-Preferred Promoters」との表題の同時係属中の出願(米国出願番号第60/097, 233号、1998年8月20日出願)(これらは、本明細書中で参考として援用される)を参照のこと)。ガマーゼイン(Gamazein)は、好ましい内乳特異的プロモーターである。Globalは、好ましい胚特異的プロモーターである。双子葉植物について、種子特異的プロモーターには、以下が挙げられるが、これらに限定されない: マメβ-ファゼオリン、ナピン(napin)、β-コンゲルシニン、ダイズレクチン、クルシフェリン(cruciferin)など。単子葉植物について、種子特異的プロモーターには、以下が挙げられるが、これらに限定されない: トウモロコシ15kDaゼイン、22kDaゼイン、27kDaゼイン、g-ゼイン、ろう(waxy)、シュランクン(shrunken)1、シュランクン2、グロブリン1など。【0044】異種および非異種(すなわち、内因性の)の両方のプロモーターが、本発明の核酸の発現を指向するために利用され得る。これらのプロモーターはまた、所望の組織におけるRPAの含量および/または組成を減少、増加、または変更するために、あるいは不稔植物を産生するために、アンチセンス核酸の発現を駆動するために、例えば、組換え発現カセットにおいて、使用され得る。必要に応じて、種々の供給源由来のRPA核酸が、上述のように、雄性不稔性植物を作製するために利用され得る。任意の実施態様において、RPA遺伝子またはcDNAは、上述の5126のような薬特異的プロモーターに作動可能に連結される。好ましくは、この雄性不稔性植物はトウモロコシである。【0045】従って、いくつかの実施態様において、核酸構築物は、本発明のポリヌクレオチドに作動可能に連結された、植物細胞(例えば、Xema ys)におけるプロモーター機能を含む。これらの実施態様において有用であるプロモーターには、本発明のポリペプチドの発現を駆動する内因性プロモーターが挙げられる。【

0046】いくつかの実施態様において、プロモーターまたはエンハンサーエレメントとして役立つ単離された核酸は、本発明のポリヌクレオチドの非異種形態の適切な位置(一般的には上流)に組み込まれ得、その結果、本発明のポリヌクレオチドの発現を上方制御または下方制御する。例えば、内因性プロモーターは、インピボで、変異、欠失、および/または置換によって変化され得る(Kmiec、米国特許第5, 565, 350号; Zarlingら、PCT/US93/03868を参照のこと)か、または単離されたプロモーターは、RPA遺伝子からの適切な方向および距離で植物細胞へ組み込まれ得、その結果、この遺伝子の発現を制御する。遺伝子発現は、植物成長のために適切な条件下で調節され得、その結果、RPAの含量および/または組成を変化させ得る。従って、本発明は、異種プロモーターおよび/またはエンハンサーを本発明のポリヌクレオチドのネイティブな内因性(すなわち、非異種)形態に作動可能に連結させるための組成物および方法を提供する。

【0047】特定の発現パターンを有するプロモーターを同定するための方法は、例えば組織型、細胞型、発生段階、および/または環境条件の観点から、当該分野で周知である。例えば、The Maize Handbook, Chapters 114-115, FreelingおよびWalbot編、Springer、New York(1994); Corn and Corn Improvement, 第3版、第6章、SpragueおよびDudley編、American Society of Agronomy、Madison、Wisconsin(1998)を参照のこと。プロモーター単離方法における典型的な工程は、標的組織においていくらかの程度の特異性で発現される遺伝子産物の同定である。方法論の範囲の中には以下がある: cDNAライブラリへの示差的ハイブリダイゼーション; 消去(subtractive)ハイブリダイゼーション; 示差ディスプレイ; 示差的2Dタンパク質ゲル電気泳動; DNAプローブアレイ; および標的組織においていくらかの特異性を有して発現されることが公知であるタンパク質の単離。このような方法は、当業者に周知である。プロモーターを同定するために市販の製品は、当該分野に公知であり、例えば、Clontech's (Palo Alto, CA) Universal GenomeWalker Kitである。【0048】

タンパク質に基づく方法には、同定されたタンパク質の少なくとも一部分のアミノ酸配列を得て、次いでゲノムDNAを、直接的にか、または好ましくは標的組織から調製されたライブラリーからcDNAクローンを同定するかのいずれかで、同定するためのプローブとして用いられ得る核酸を調製するための基礎としてこのタンパク質配列を用いることが有益である。一旦このようなcDNAクローンが同定されたなら、この配列を用いて、

示された遺伝子の転写物の5'末端の配列を同定し得る。ディファレンシャルハイブリダイゼーション、サブトラクティブハイブリダイゼーションおよびディファレンシャルディスプレイには、標的組織中に富化されたとして同定された核酸配列を用いて、示された遺伝子の転写物の5'末端の配列を同定する。一旦このような配列が同定されると、タンパク質配列または核酸配列のいずれかから出発して、遺伝子転写物からであるとして同定されたこれら配列のいずれをも用いて、標的生物から調製されたゲノムライブラリーをスクリーニングし得る。10 転写開始部位を同定および確認する方法は、当該分野で周知である。【0049】 特定の環境条件もしくはストレス下、または特定組織、または特定の発生ステージで発現されるプロモーターを単離するプロセスでは、所望の環境下、所望の組織中、または所望のステージで発現される多くの遺伝子が同定される。さらなる分析は、植物の1つ以上の他の組織中の各特定の遺伝子の発現を示す。所望の組織または条件において活性を持つが、任意のその他の通常組織では活性を持たないプロモーターを同定し得る。【0050】 プロモーター配20 列を同定するために、本明細書に記載されるクローンの5'部分が、プロモーター配列の特徴的な配列について分析される。例えば、プロモーター配列エレメントは、通常、転写開始部位の約20~40塩基対上流に位置する、5~10bpのATリッチなストレッチである、TATAボックスコンセンサス配列(TATAAT)を含む。TATAボックスの同定は、当該分野で周知である。例えば、このエレメントの位置を推定する1つの方法は、プライマー伸長、S1分析、および/またはRNAse保護のような、標準的なRNAマッピング技法を30 用いて、転写開始部位を同定することである。ATリッチ配列の存在を確認するために、構造-機能分析が実施され得、この分析は、推定領域の変異誘発、および連結された下流レポーター遺伝子の発現に対する変異の影響の定量を含む。例えば、The Maize Handbook、第114章、FreelingおよびWalbot編、Springer、New York、(1994)を参照のこと。【0051】 植物では、代表的には、TATAボックスからさらに上流の-80~-100位に、トリヌクレオチドG(またはT)NGを取り囲む一連のアデニンを持つプロモーター要素(すなわちCAATボックス)がある。J. Messingら、Genetic Engineering in Plants、Kosage、MeredithおよびHollaender編、221~227頁(1983)。トウモロコシでは、良く保存されたCAATボックスはないが、TATAボックスの上流にいくつかの短い、保存されたタンパク質結合モチーフがある。これらは、各遺伝子について適切な、光調節、嫌氣的誘導、ホルモン調節、またはアントシアニン生合成に関与するト50

ランス作用性転写因子のためのモチーフを含む。【0052】 一旦プロモーターおよび/または遺伝子配列が知られると、適切なサイズの領域が、転写開始、または翻訳開始部位に対して5'にあるゲノムDNAから選択され、次いでこのような配列は、コード配列に連結される。転写開始部位が、融合の点として用いられる場合、多くの可能な5'非翻訳領域のいずれをも、転写開始部位と部分コード配列との間において用い得る。特定のプロモーターの3'末端にある翻訳開始部位が用いられる場合、コード配列のメチオニン開始コドンに直接連結される。【0053】 ポリペプチド発現が所望される場合、一般に、ポリヌクレオチドコード領域の3'末端にポリアデニル化領域を含めることが所望される。このポリアデニル化領域は、天然遺伝子、種々の他の植物遺伝子、またはT-DNAに由来し得る。付加されるべき3'末端配列は、例えば、ノバリンシンターゼ遺伝子もしくはオクトピンシンターゼ遺伝子、または別の植物遺伝子、あるいはさほど好ましくはないが任意の他の真核生物遺伝子に由来し得る。【0054】 イントロン配列は、5'非翻訳領域または部分コード配列のコード配列に付加され、細胞質ゾル中に蓄積する成熟メッセージの量を増加し得る。植物および動物の両方の発現構築物において、転写ユニット中のスプライシング可能なイントロンを含めると、1000倍までmRNAレベルおよびタンパク質レベルの両方で遺伝子発現を増大することが示されている。Buchmanら(1988) Mol. Cell Biol. 8:4395~4405; Callisら(1987) Genes Dev. 1:1183~1200。このような遺伝子発現のイントロン増大は、代表的には、転写ユニットの5'末端近くに配置されたとき最大である。トウモロコシイントロンAdh1-Sイントロン1、2、および6、Bronze-1イントロンの使用が当該分野で公知である。一般に、The Maize Handbook、第116章、FreelingおよびWalbot編、Springer、New York(1994)を参照のこと。【0055】 本発明のポリヌクレオチドからの配列を含むベクターは、形質転換された細胞または組織の選択についての選択マーカー遺伝子を含み得る。選択マーカー遺伝子は、抗生物質耐性をコードする遺伝子(例えば、ネオマシンホスホトランスフェラーゼII(NEO)をコードする遺伝子およびハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ(HPT)をコードする遺伝子、ならびに除草剤化合物(例えば、グルホシネートアンモニウム(glufosinate ammonium)、プロモキシニル、イミダゾリノン、および2,4-ジクロロフェノキシアセテート(2,4-D))に対する抵抗性を有する遺伝子)を含む。一般には、Yarranton(1992) Curr. Opin. Biotech. 3:506~511; Christopher

sonら(1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6314~6318; Yaoら(1992) Cell 71:63~72; Reznikoff(1992) Mol. Microbiol. 6:2419~2422; Barkleyら(1980) The Operon, 177~220頁; Huら(1987) Cell 48:555~566; Brownら(1987) Cell 49:603~612; Figggeら(1988) Cell 52:713~722; Deuschleら(1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5400~5404; Fuerstら(1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:2549~2553; Deuschleら(1990) Science 248:480~483; Gossen(1993) Ph. D. Thesis, University of Heidelberg; Reinesら(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:1917~1921; Labowら(1990) Mol. Cell. Biol. 10:3343~3356; Zambrettiら(1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:3952~3956; Baimら(1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:5072~5076; Wyborskiら(1991) Nucleic Acids Res. 19:4647~4653; Hillenand-Wissman(1989) Topics Mol. Struc. Biol. 10:143~162; Degenkolbら(1991) Antimicrob. Agents Chemother. 35:1591~1595; Kleinschmidtら(1988) Biochemistry 27:1094~1104; Bonin(1993) Ph. D. Thesis, University of Heidelberg; Gossenら(1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5547~5551; Olivaら(1992) Antimicrob. Agents Chemother. 36:913~919; Hlavkaら(1985) Handbook of Experimental Pharmacology, 第78巻(Springer-Verlag, Berlin); Gillら(1988) Nature 334:721~724を参照のこと。このような開示は、本明細書中に参考として援用する。【0056】上に列挙した選択マーカー遺伝子は、限定の意味ではない。任意の選択マーカー遺伝子が、本発明において使用され得る。【0057】高等植物における遺伝子の発現のために有用な代表的なベクターは、当該分野で周知であり、そしてRogersら(1987) Meth. in Enzymol., 153:253~277によつ

て記載される *Agrobacterium tumefaciens* の腫瘍誘導 (Ti) プラスミドに由来するベクターを含む。これらのベクターは、形質転換において、このベクターが宿主植物のゲノム中にベクターDNAの一部を組込む、という点で、植物組込みベクターである。本明細書中で有用な、例示的 *A. tumefaciens* ベクターは、Schardlら(1987) Gene, 61:1~11およびBergerら(1989) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 86:8402~8406のプラスミドpKYLX6およびpKYLX7である。本明細書中の別の有用なベクターは、Clontech Laboratories, Inc. (Palo Alto, CA) から入手可能であるプラスミドpBI101.2である。【0058】上記のように、本発明のポリヌクレオチドは、センス配向かまたはアンチセンス配向のいずれかで所望されるように発現され得る。センス配向かまたはアンチセンス配向のいずれかにおける遺伝子発現の制御は、観察可能な植物の特性に対する直接の影響を有し得ることが理解される。アンチセンス技術が、植物における遺伝子発現のために簡便に使用され得る。このことを達成するために、所望の遺伝子からの核酸セグメントはクローニングされ、そしてプロモーターに作動可能に連結されて、その結果RNAのアンチセンス鎖が転写される。次いで、この構築物は、植物に形質転換され、そしてRNAのアンチセンス鎖が産生される。植物細胞では、アンチセンスRNAが目的の酵素をコードするmRNAの蓄積を防げることによって遺伝子発現を阻害することが示されている(例えば、Sheehyら(1998) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85:8805~8809; およびHiattら、米国特許第4,801,340号を参照のこと)。【0059】本発明の方法において、RPA構築物についての全体のコード配列が、使用され得ることが理解される。あるいは、この配列の部分またはフラグメントが、DNA構築物において使用され得る。【0060】開示されたヌクレオチド配列およびそれによりコードされたタンパク質のフラグメントおよび改変体もまた、本発明により包含される。「フラグメント」によって、ヌクレオチド配列の一部またはアミノ酸配列の一部、従って、それによってコードされるタンパク質もまた意図される。ヌクレオチド配列のフラグメントは、ネイティブタンパク質の生物学的活性を保持するタンパク質フラグメントをコードし得、従って、DNA代謝を調節し得る。あるいは、ハイブリダイゼーションプローブとして有用なヌクレオチド配列のフラグメントは、一般に、生物学的活性を保持するフラグメントタンパク質をコードしない。従って、ヌクレオチド配列のフラグメントは、少なくとも約20ヌクレオチド、約50ヌクレオチド、約100ヌクレオチドから、本発明のタンパク質をコードする全長

ヌクレオチド配列までの範囲であり得る。【0061】本発明のRPAタンパク質の生物学的に活性な部分をコードする、RPAヌクレオチド配列のフラグメントは、少なくとも15、25、30、50、100、150、200、または250の連続するアミノ酸、または本発明の全長RPAタンパク質に存在するアミノ酸の総数まで（例えば、配列番号2、4、12、14、16、18、20、および22については、それぞれ623、617、273、273、273、318、273、273アミノ酸）をコードする。PCRプライマーのためのハイブリダイゼーションプローブとして有用であるRPAヌクレオチド配列のフラグメントは、一般に、RPAタンパク質の生物学的に活性な部分をコードする必要はない。【0062】従って、RPAヌクレオチド配列のフラグメントは、RPAタンパク質の生物学的に活性な部分をコードし得るか、またはそれは、以下に開示の方法を用いてハイブリダイゼーションプローブまたはPCRプライマーとして用いられ得るフラグメントであり得る。RPAタンパク質の生物学的に活性な部分は、本発明のRPAヌクレオチド配列の1つの部分を単離し、そのRPAタンパク質のコードされた部分を発現させ（例えば、インビトロで組換え発現により）、そしてRPAタンパク質のコードされた部分の活性を評価することにより調製され得る。RPAヌクレオチド配列のフラグメントである核酸分子は、少なくとも16、20、50、75、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、800、900、1,000ヌクレオチド、または本明細書中に開示された全長RPAヌクレオチド配列に存在するヌクレオチドの数（例えば、配列番号1、3、11、13、15、17、19、および21については、それぞれ2497、2202、1124、979、1051、1087、1074、および1231ヌクレオチド）までを含む。【0063】「改変体」とは、実質的に類似の配列を意図する。ヌクレオチド配列については、保存的改変体は、遺伝暗号の縮重のために、本発明のRPAポリペプチドの1つのアミノ酸配列をコードする配列を含む。このような天然に存在する改変体（天然に存在する対立遺伝子改変体を含む）は、周知の分子生物学技術（例えば、以下に概説するようなポリメラーゼ連鎖反応（PCR）およびハイブリダイゼーション技術）の使用によって同定され得る。改変体ヌクレオチド配列はまた、合成的に誘導されたヌクレオチド配列（例えば、部位指向性変異誘発を用いることによって生成されたが、本発明のRPAタンパク質をなおコードする配列など）を包含する。一般に、本発明の特定のヌクレオチド配列の改変体は、デフォルトパラメータを使用する本明細書の他の箇所に記載の配列アラインメントプログラムによって決定されるように、その特定のヌクレオチド配列に対して少なくとも40

％、50％、60％、70％、一般的には、少なくとも75％、80％、85％、好ましくは、約90～95％以上、そしてより好ましくは、約98％以上の配列同一性を有する。【0064】「改変体」タンパク質とは、ネイティブタンパク質のN末端および／またはC末端への1つ以上のアミノ酸の欠失（いわゆる短縮化）または付加；ネイティブタンパク質の1つ以上の部位での1つ以上のアミノ酸の欠失または付加；あるいはネイティブタンパク質の1つ以上の部位での1つ以上のアミノ酸の置換によりネイティブタンパク質から誘導されたタンパク質を意図する。本発明に含まれる改変体タンパク質は、生物学的に活性であり、すなわちこれらの改変体は、ネイティブタンパク質の所望の生物学的活性（すなわち、本明細書に記載のように、DNA代謝を調節する）を保持し続ける。このような改変体は、例えば、遺伝的多型または人為操作から生じ得る。本発明のネイティブRPAタンパク質の生物学的に活性な改変体は、デフォルトパラメータを使用する本明細書の他の箇所に記載の配列アラインメントプログラムによって決定されるように、そのネイティブタンパク質のアミノ酸配列に対して少なくとも40％、50％、60％、70％、一般的には、少なくとも75％、80％、85％、好ましくは、約90～95％以上、そしてより好ましくは、約98％以上の配列同一性を有する。本発明のタンパク質の生物学的に活性な改変体は、ほんの1～15個のアミノ酸残基、ほんの1～10個、例えば、6～10個、ほんの5個、ほんの4、3、2、または1個のアミノ酸残基だけ、そのタンパク質と異なり得る。【0065】本発明のタンパク質は、種々の方法（アミノ酸の置換、欠失、短縮化、および挿入を包含する）で変化され得る。このような操作のための方法は、一般に、当該分野で公知である。例えば、RPAタンパク質のアミノ酸配列改変体は、DNAにおける変異によって調製され得る。変異誘発およびヌクレオチド配列改変のための方法は、当該分野で周知である。例えば、Kunkel (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. US A 82:488～492; Kunkelら (1987) Methods in Enzymol. 154:367～382; 米国特許第4,873,192号; WalkerおよびGaastra編 (1983) Techniques in Molecular Biology (MacMillian Publishing Company, New York) およびその中で引用されている参考文献を参照のこと。目的のタンパク質の生物学的活性に影響しない適当なアミノ酸置換に関する指針は、Dayhoffら (1978) Atlas of Protein Sequence and Structure (Natl. Biomed. Res. Found. Washington, D. C.、これは、参考として本明細書中に援用される) のモデルに見

出され得る。保存的置換（例えば、1つのアミノ酸を同様の特性を有する別のものと交換する置換）が好ましいとされ得る。【0066】 従って、本発明の遺伝子およびヌクレオチド配列は、天然に存在する配列ならびに変異形態の両方を包含する。同様に、本発明のタンパク質は、天然に存在するタンパク質ならびにその改変形態および変異形態の両方を包含する。このような改変体は、DNA代謝に影響を与える際に、所望の活性を保持しつづける。明らかに、改変体をコードするDNAにおいて作製される変異は、この配列をリーディングフレーム外としてはならず、そして好ましくは、二次mRNA構造を生成し得る相補領域を作出しない。EP特許出願公開第75, 444号を参照のこと。【0067】

本明細書中に包含されるタンパク質配列の欠失、挿入、および置換は、タンパク質の特徴に根本的な変化を生じるとは期待されない。しかし、そうするよりも前に置換、欠失、または挿入の正確な効果を推定することが困難である場合、当業者は、この効果が慣用のスクリーニングアッセイにより評価されることを理解する。すなわち、活性は、DNA結合、組換え、修復および複製を評価することによって調べられ得る。例えば、Braunら(1997) *Biochemistry* 36:8443-8454; Longheseら(1994) *Molecular and Cellular Biology* 14:7884-7890; Stiggerら(1998) *J. Biol. Chem.* 273:9337-9343; Abremovaら(1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:7186-7191; Newら(1998) *Nature* 391:407-410; Bochkarevaら(1998) *J. Biol. Chem.* 273(7):3932-6; Massら(1998) *Mol. Cell Biol.* 18(11):6399-407; Lavrikら(1998) *Nucleic Acids Res* 26(2):602-7; Sibenalleら(1998) 37(36):12496-506; Matsunagaら(1996) *J. Biol. Chem.* 271(19):11047-50; および Sung(1997) *Genes & Development* 11:1111-21 (本明細書中に参考として援用される)を参照のこと。【0068】 改変体ヌクレオチド配列およびタンパク質はまた、DNAシャッフリングのような変異誘発および組換え生成手順に由来する配列およびタンパク質を包含する。このような手順を用いて、1つ以上の異なるRPAコード配列が、所望の特性を有する新規なRPAを作出するように操作され得る。このように、組換えポリヌクレオチドのライブラリーは、実質的な配列同一性を有しかつインビトロまたはインビボで相同組換えされ得る配列領域を含む関連配列ポリヌクレオチドの集団から生成される。例えば、こ

のアプローチを用いて、目的のドメインをコードする配列モチーフは、本発明のRPA遺伝子と他の公知のRPA遺伝子との間でシャッフリングされて、これにより、目的の改善された特性（例えば、酵素の場合、 K_m の増大）を有するタンパク質をコードする新規な遺伝子入手し得る。このようなDNAシャッフリングについての戦略は、当該分野で公知である。例えば、Stemmer(1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10747-10751; Stemmer(1994) *Nature* 370:389-391; Cramerら(1997) *Nature Biotech.* 15:436-438; Mooreら(1997) *J. Mol. Biol.* 272:336-347; Zhangら(1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4504-4509; Cramerら(1998) *Nature* 391:288-291; および米国特許第5, 605, 793号および同第5, 837, 458号を参照のこと。【0069】 これらのヌクレオチド配列を使用して、RPA配列についてのメッセンジャーRNA(mRNA)の少なくとも一部に相補的なアンチセンス構築物が構築され得ることが、認識される。対応するmRNAとハイブリダイズするアンチセンスヌクレオチドが構築される。アンチセンス配列の改変は、この配列が、対応するmRNAにハイブリダイズし、そしてその発現を妨げる限り、行われ得る。このように、対応するアンチセンス配列に対して、70%、好ましくは80%、より好ましくは85%の配列類似性を有するアンチセンス構築物が、使用され得る。さらに、アンチセンスヌクレオチドの部分が、標的遺伝子の発現を破壊するために使用され得る。一般に、少なくとも50ヌクレオチド、100ヌクレオチド、200ヌクレオチドの配列が使用され得る。【0070】 本発明のヌクレオチド配列はまた、植物における内因性遺伝子の発現を抑制するためにセンス方向で使用され得る。センス方向のヌクレオチド配列を使用して植物における遺伝子発現を抑制するための方法は、当該分野で公知である。この方法は、一般に、内因性遺伝子の転写物に対応するヌクレオチド配列の少なくとも一部に作動可能に連結された、植物における発現を駆動するプロモーターを含むDNA構築物での植物の形質転換を包含する。代表的には、このようなヌクレオチド配列は、内因性遺伝子の転写物の配列に対して実質的な配列同一性、好ましくは、約65%より大きい配列同一性、より好ましくは、約85%より大きい配列同一性、最も好ましくは、約95%より大きい配列同一性を有する。例えば、米国特許第5, 283, 184号および同第5, 034, 323号(本明細書中に参考として援用される)を参照のこと。【0071】 抗体産生のためのこのポリペプチドおよびタンパク質、ならびにそれらのフラグメントおよび改変体の使用もま

た、本発明によって包含される。本発明は、RPAタンパク質レベルを決定するため、およびRPAの1つ以上の生物学的活性または相互作用を調整するための、このような抗体の使用もまた包含する。抗体の産生のための方法は、当該分野で公知である。例えば、HarlowおよびLane、antibodies、A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Publications、New York (1988) を参照のこと；参考文献がその中で引用されている。【0072】 本発明のRPA配列は、目的の植物における発現の増強のために最適化され得る。例えば、EPA0359472；WO91/16432；Perlakら (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:3324-3328；およびMurrayら (1989) Nucleic Acids Res. 17:477-498を参照のこと。このように、遺伝子は、この植物選択的コドンを利用して合成され得る。例えば、Murrayら (1989) Nucleic Acids Res. 17:477-498 (この開示内容は、本明細書中に参考として援用される) を参照のこと。このように、合成遺伝子はまた、特定の宿主が特定のアミノ酸について使用するコドンの分布に基づいて作製され得る。従って、このヌクレオチド配列は、いずれの植物における発現についても最適化され得る。遺伝子配列の全てまたはどの部分も最適化され得るか、または合成物であり得ることが認識される。すなわち、合成配列または部分的に最適化された配列もまた使用され得る。【0073】 従って、本発明のヌクレオチド配列およびそれによりコードされたタンパク質は、ネイティブの形態ならびにその改変体を包含する。改変体タンパク質は、ネイティブタンパク質に対して実質的に相同であり、そして機能的に等価である。ネイティブタンパク質の改変体は、そのアミノ酸配列の少なくとも約80%、より好ましくは少なくとも約90%、および最も好ましくは少なくとも約95%が、天然タンパク質のアミノ酸配列に同一である場合、ネイティブタンパク質に対して「実質的に相同」である。「機能的に等価」とは、改変体の配列が、目的のネイティブタンパク質と実質的に同じ生物学的効果を有するタンパク質を生成する鎖を規定することを意図する。実質的な配列変化を含むこのような機能的に等価な改変体もまた、本発明によって包含される。【0074】 本発明のヌクレオチド配列は、他の生物、特に他の植物、より特定すると他の単子葉植物から対応する配列を単離するために使用され得る。このように、PCR、ハイブリダイゼーションなどのような方法が、本明細書中に記載の配列に対するそれらの配列相同性に基づいてこのような配列を同定するために使用され得る。本明細書中に記載のRPA配列全体に対する、またはそれらのフラグメントに対する、それらの配列同一性に基づ

いて単離された配列は、本発明によって包含される。

【0075】 PCRアプローチにおいて、オリゴヌクレオチドプライマーは、目的の任意の植物から抽出されたcDNAまたはゲノムDNAからの対応するDNA配列の増幅のための、PCR反応における使用のために設計され得る。PCRプライマーを設計する方法およびPCRクローニングのための方法は、一般的に、当該分野で公知であり、そしてSambrookら (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Plainview、New York) に開示される。また、Innisら編、(1990) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Academic Press、New York)；InnisおよびGelfand編 (1995) PCR Strategies (Academic Press、New York)；ならびにInnisおよびGelfand編 (1999) PCR Methods Manual (Academic Press、New York) を参照のこと。PCRの公知の方法としては、プライマー対 (paired primer)、入れ子 (nested) プライマー、単一の特異的プライマー、縮重プライマー、遺伝子特異的プライマー、ベクター特異的プライマー、部分ミスマッチプライマーなどを用いる方法が挙げられるが、これらに限定されない。【0076】 ハイブリダイゼーション技術において、公知のヌクレオチド配列の全てまたは部分が、選択された生物由来のクローン化されたゲノムDNAフラグメントまたはcDNAフラグメントの集団 (すなわち、ゲノムライブラリーまたはcDNAライブラリー) 中に存在する他の対応するヌクレオチド配列に選択的にハイブリダイズするプローブとして使用される。このハイブリダイゼーションプローブは、ゲノムDNAフラグメント、cDNAフラグメント、RNAフラグメント、または他のオリゴヌクレオチドであり得、そして検出可能な基 (例えば、³²P) または任意の他の検出可能なマーカーで標識化され得る。従って、例えば、ハイブリダイゼーションのためのプローブは、本発明のRPA配列に基づく合成オリゴヌクレオチドを標識することによって作製され得る。ハイブリダイゼーションのため、ならびにcDNAライブラリーおよびゲノムライブラリーの構築のためのプローブの調製のための方法は、一般に、当該分野で公知であり、そしてSambrookら (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Plainview、New York) において開示される。【0077】 例えば、本明細書中に開

示されたRPAの配列全体、またはそれらの1つ以上の部分が、対応するRPA配列およびメッセンジャーRNAに特異的にハイブリダイズし得るプローブとして使用され得る。種々の条件下で特異的なハイブリダイゼーションを達成するために、このようなプローブは、RPA配列間で独特であり、そして好ましくは少なくとも約10ヌクレオチド長、最も好ましくは少なくとも約20ヌクレオチド長である配列を包含する。このようなプローブは、選択された植物から対応するRPA配列をPCRによって増幅するために使用され得る。この技術は、所望の植物からさらなるコード配列を単離するために、または植物中のコード配列の存在を決定するための診断アッセイとして、使用され得る。ハイブリダイゼーション技術は、プレATINGしたDNAライブラリーのハイブリダイゼーションスクリーニングを包含する（ブランクまたはコロニーのいずれか；例えば、Sambrookら（1989）Molecular Cloning: A Laboratory Manual（第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Plainview, New York）を参照のこと。【0078】このような配列のハイブリダイゼーションは、ストリンジントな条件下で実施され得る。「ストリンジントな条件」または「ストリンジントなハイブリダイゼーション条件」とは、プローブが、他の配列に対するよりも、検出可能に大きな程度（例えば、バックグラウンドに対して少なくとも2倍）で、その標的配列に対してハイブリダイズする条件を意図する。ストリンジントな条件は配列依存性であり、そして異なる環境下で異なる。ハイブリダイゼーションおよび／または洗浄条件のストリンジエンシーを制御することにより、プローブに対して100%相補的である標的配列が同定され得る（相同プロービング）。あるいは、ストリンジエンシー条件は、より低い程度の類似性が検出されるように、配列中でいくらかミスマッチとなることが可能になるように調整され得る（非相同プロービング）。一般に、プローブは、約1000ヌクレオチド長未満であり、好ましくは500ヌクレオチド長未満である。【0079】代表的には、ストリンジントな条件は、塩濃度が約1.5M Naイオン未満であり、代表的には約0.01~1.0M Naイオン濃度（または他の塩）（pH7.0から8.3）であり、そして温度が、短いプローブ（例えば、10~50ヌクレオチド）については少なくとも約30℃であり、そして長いプローブ（例えば、50ヌクレオチドより大きい）については少なくとも約60℃である条件である。ストリンジントな条件はまた、不安定化剤（例えば、ホルムアミド）の添加によって達成され得る。例示の低いストリンジエンシー条件は、30~35%ホルムアミド、1M NaCl、1% SDS（ドデシル硫酸ナトリウム）の緩衝溶液を用いる37℃での

ハイブリダイゼーション、および1×から2×のSSC（20×SSC=3.0M NaCl/0.3Mクエン酸三ナトリウム）を用いる50~55℃での洗浄を包含する。例示の中程度のストリンジエンシー条件は、40~45%ホルムアミド、1.0M NaCl、1% SDS中での37℃でのハイブリダイゼーション、および0.5×から1×のSSCを用いる55~60℃での洗浄を包含する。例示の高いストリンジエンシー条件は、50%ホルムアミド、1M NaCl、1% SDS中での37℃でのハイブリダイゼーション、および0.1×のSSCを用いる60~65℃での洗浄を包含する。【0080】特異性は、代表的には、ハイブリダイゼーション後の洗浄の回数であり、決定的な要因は、最終洗浄溶液のイオン強度および温度である。DNA-DNAハイブリッドについては、 T_m は、MeinkothおよびWahl（1984）Anal. Biochem. 138:267-284の式： $T_m = 81.5^\circ\text{C} + 16.6(\log M) + 0.41(\%GC) - 0.61(\%form) - 500/L$ から概算され得；ここでMは、1価カチオンのモル濃度であり、%GCは、DNA中のグアノシンヌクレオチドおよびシトシンヌクレオチドのパーセンテージであり、%formは、ハイブリダイゼーション溶液中のホルムアミドのパーセンテージであり、そしてLは、塩基対中のハイブリッドの長さである。 T_m は、相補的な標的配列の50%が完全に一致するプローブにハイブリダイズする温度（規定されたイオン強度およびpHで）である。 T_m は、1%のミスマッチにつき約1℃低下する；従って、 T_m 、ハイブリダイゼーション、および／または洗浄条件は、所望の同一性の配列にハイブリダイズするように調整され得る。例えば、90%以上の同一性を有する配列が求められる場合、 T_m は、10℃低下し得る。一般的に、ストリンジントな条件は、規定されたイオン強度およびpHでの特定の配列およびその相補物に対する熱融解温度（ T_m ）よりも約5℃低く選択される。しかし、厳しいストリンジントな条件は、熱融解温度（ T_m ）よりも1、2、3、または4℃低いハイブリダイゼーションおよび／または洗浄を利用し得；中程度のストリンジントな条件は、熱融解温度（ T_m ）よりも6、7、8、9、または10℃低いハイブリダイゼーションおよび／または洗浄を利用し得；低いストリンジントな条件は、熱融解温度（ T_m ）よりも11、12、13、14、15、または20℃低いハイブリダイゼーションおよび／または洗浄を利用し得る。この式、ハイブリダイゼーションおよび洗浄の組成、ならびに所望される T_m を使用して、当業者は、ハイブリダイゼーションおよび／または洗浄溶液のストリンジエンシーにおけるバリエーションが本質的に記載されることを理解する。所望されるミスマッチの程度が45℃（水溶液）または32℃（ホルムアミド溶液）よりも低い T_m を生じる場合、より高い温

度が使用され得るようにSSC濃度を増加させることが好ましい。核酸のハイブリダイゼーションについての広範なガイドは、Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes*, 第1部、第2章 (Elsevier, New York); および Ausubelら編 (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*, 第2章 (Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York) に見出される。Sambrookら (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York) を参照のこと。【0081】 従って、プロモーター活性を有するかまたはRPAタンパク質をコードし、かつ本明細書中に開示されるRPA配列にもしくはそのフラグメントにストリンジェントな条件下でハイブリダイズする単離された配列、あるいはそのフラグメントは、本発明に含まれる。このような配列は、開示される配列と、少なくとも40%~50%相同であり、約60%~70%相同であり、そしてさらに約75%、80%、85%、90%、95%~98%以上相同である。すなわち、配列の配列同一性は、少なくとも約40%~50%、約60%~70%、およびさらに約75%、80%、85%、90%、95%~98%以上の配列同一性を共有する範囲にわたり得る。【0082】 以下の用語を使用して、2つ以上の核酸またはポリヌクレオチドの間の配列の関係を記載する：(a)「参照配列」、(b)「比較ウィンドウ」、(c)「配列同一性」、(d)「配列同一性のパーセンテージ」、および(e)「実質的に同一」。【0083】 (a) 本明細書において使用される場合、「参照配列」は、配列比較について基準として使用される規定された配列である。参照配列は、指定の配列のサブセットまたはその全体であり得る；例えば、全長cDNAまたは遺伝子配列のセグメントとして、あるいは完全なcDNAまたは遺伝子配列。【0084】 (b) 本明細書中で使用される場合、「比較ウィンドウ」は、ポリヌクレオチド配列の連続した、かつ指定されたセグメントをいい、ここで、比較ウィンドウにおけるポリヌクレオチド配列は、2つの配列の最適なアライメントのために、参照配列（これは付加も欠失も含まない）と比較して、付加または欠失（すなわち、ギャップ）を含み得る。一般的に、比較ウィンドウは、少なくとも20の連続したヌクレオチド長であり、そして必要に応じて、30、40、50、100以上であり得る。当業者は、ポリヌクレオチド配列中

にギャップを含むことに起因する参照配列に対する高い類似性を回避するために、ギャップペナルティーが、代表的に導入され、そして適合の数から減算されることを理解する。【0085】 比較のための配列のアライメントの方法は、当該分野において周知である。従って、任意の2つの配列間のパーセント同一性の決定は、数学的アルゴリズムを使用して達成され得る。好ましくは、このような数学的アルゴリズムの非限定的な例は、以下である：MyersおよびMiller (1988) CABIOS 4:11-17のアルゴリズム；Smithら (1981) Adv. Appl. Math. 2:482の局所相同性アルゴリズム；NeedlemanおよびWunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443-453の相同性アライメントアルゴリズム；PearsonおよびLipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:2444-2448の類似性についての検索方法；KarlinおよびAltschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877において改変された、KarlinおよびAltschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264のアルゴリズム。

【0086】 これらの数学的アルゴリズムのコンピューター化インプリメンテーションは、配列同一性を決定するための配列の比較に利用され得る。このようなインプリメンテーションとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：PC/GenieプログラムのCLUSTAL (Intelligentics, Mountain View, Californiaから入手可能)；ALIGNプログラム (Version 2.0)、ならびにWisconsin Genetics Software Package (Version 8)のGAP、BESTFIT、BLAST、FASTAおよびTFASTA (Genetics Computer Group (GCG)、575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USAから入手可能)。これらのプログラムを使用するアライメントは、デフォルトパラメーターを使用して実行される。CLUSTALプログラムは、以下により十分に記載される：Higginsら (1988) Gene 73:237-244 (1988)；Higginsら (1989) CABIOS 5:151-153；Corpetら (1988) Nucleic Acids Res. 16:10881-90；Huangら (1992) CABIOS 8:155-65ならびにPearsonら (1994) Met. Mol. Biol. 24:307-331。ALIGNプログラムは、MyersおよびMiller (1988) 前出のアルゴリズムに基づく。PAM120重み残基表、12のギャップ長ペナルティー、および4のギャップペナル

ティーは、アミノ酸配列を比較する場合にALIGNプログラムと共に使用され得る。Altschulら(1990) J. Mol. Biol. 215:403のBLASTプログラムは、KarlinおよびAltschul(1990)前出のアルゴリズムに基づく。BLASTヌクレオチド検索を、BLASTNプログラム、スコア=100、ワード長=12を用いて実行し、本発明のタンパク質をコードするヌクレオチド配列に相同なヌクレオチド配列を獲得する。BLASTタンパク質検索を、BLASTXプログラム、スコア=50、ワード長=3を用いて実行し、本発明のタンパク質またはポリペプチドに相同なアミノ酸配列を獲得する。比較目的のためのギャップ化されたアライメントを得るために、Gapped(ギャップ化)BLAST(BLAST2.0における)は、Altschulら(1997) Nucleic Acids Res. 25:3389に記載されるように利用され得る。あるいは、PSI-BLAST(BLAST2.0における)を使用して、分子間の距離関係を検出する繰り返し検索を実行し得る。Altschulら(1997)前出を参照のこと。BLAST、Gapped BLAST、PSI-BLASTを利用する場合、それぞれのプログラムのデフォルトパラメーター(例えば、ヌクレオチド配列に対するBLASTN、タンパク質に対するBLASTX)を使用し得る。http://www.ncbi.nlm.nih.govを参照のこと。アライメントはまた、目視によって手動的に実行され得る。【0087】 本発明の目的のために、本明細書中に開示されるRPA配列に対するパーセント配列同一性の決定のための、ヌクレオチド配列またはタンパク質配列の比較は、好ましくは、GCG PileUpプログラム、バージョン10.00(そのデフォルトパラメーターを用いて)または任意の等価的なプログラムを使用して行われる。「等価的なプログラム」とは、問い合わせの任意の2つの配列について、好ましいプログラムによって作製されるその対応するアライメントと比較した場合、同一のヌクレオチドまたはアミノ酸残基の一致および同一のパーセント配列同一性を有するアライメントを作製する、任意の配列比較プログラムを意図する。【0088】 (c) 本明細書中で使用される場合、2つの核酸配列またはポリペプチド配列に関する「配列同一性」または「同一性」は、指定された比較ウィンドウにわたって最大の一致についてアライメントされた場合、同じである2つの配列の残基をいう。配列同一性のパーセンテージがタンパク質に関して使用される場合、同一でない残基位置が、しばしば保存的アミノ酸置換により異なることが認識される。ここで、アミノ酸残基は、類似の化学特性(例えば、電荷または疎水性)を有する他のアミノ酸残基で置換され、それゆえ、分子の機能特性が変化しない。配列が保存的置換において異なる場合、パーセント配列同一性は、置換

の保存的性質について補正するように上方に調整され得る。そのような保存的置換により異なる配列は、「配列類似性」または「類似性」を有するといわれる。この調整を行なう手段は、当業者に周知である。代表的に、これは、全体的なミスマッチではなく一部として保存的置換をスコア付けし、それにより、配列同一性のパーセンテージを増加させることを含む。従って、例えば、同一のアミノ酸に1のスコアを与え、そして非保存的置換に0のスコアを与える場合、保存的置換には0と1との間のスコアが与えられる。保存的置換のスコア付けは、例えば、プログラムPC/GENE(Intelligentics, Mountain View, California)において実行されるように算出される。

【0089】 (d) 本明細書中で使用する場合、「配列同一性のパーセンテージ」は、比較ウィンドウにわたって最適にアライメントされた2つの配列を比較することにより決定された値を意味し、ここで、比較ウィンドウにおけるポリヌクレオチド配列の部分は、二つの配列の最適なアライメントについて、参照配列(これは、付加も欠失も含まない)と比較した場合に、付加または欠失(すなわち、ギャップ)を含み得る。パーセンテージは、同一の核酸塩基またはアミノ酸残基が、両方の配列において現れる位置の数を決定してマッチした位置の数を得ること、マッチした位置の数を、比較ウィンドウにおける位置の総数によって除算すること、および配列同一性のパーセンテージを得るために、その結果に100をかけることにより算出される。【0090】 (e) (i) ポリヌクレオチド配列の、用語「実質的同一性」は、ポリヌクレオチドが、標準的なパラメーターを使用する、記載されるアライメントプログラムの一つを使用して参照配列と比較して、少なくとも70%の配列同一性、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、そしてもっとも好ましくは少なくとも95%を有する配列を含むことを意味する。当業者は、これらの値が、コドンの縮重、アミノ酸類似性、リーディングフレームの位置決めなどを考慮することにより、二つのヌクレオチド配列によってコードされるタンパク質の対応する同一性を決定するために適切に調整され得ることを認識する。これらの目的のためのアミノ酸配列の実質的な同一性は、通常、少なくとも60%、より好ましくは少なくとも70%、80%、90%、そしてもっとも好ましくは少なくとも95%の配列同一性を意味する。【0091】 ヌクレオチド配列が実質的に同一である別の指標は、二つの分子が、ストリンジェントな条件下で、互いにハイブリダイズするか否かである。一般的に、ストリンジェントな条件は、規定されたイオン強度およびpHにおいて、特定の配列に対する熱融点(T_m)よりも約5℃低く選択される。しかし、ストリンジェントな条件は、約1℃~約20℃の範囲にある温度を含み、これは、本明細書中で他に限定されるよ

うに、ストリンジェンシーの所望の程度に依存する。ストリンジェントな条件下で互いにハイブリダイズしない核酸は、それらがコードするポリペプチドが実質的に同一であるならば、なお実質的に同一である。これは、例えば、核酸のコピーが、遺伝コードにより許容される最大のコドン縮重を用いて作製される場合に、生じ得る。二つの核酸配列が、実質的に同一である一つの指標は、第一の核酸によりコードされるポリペプチドが、第二の核酸によりコードされるポリペプチドと、免疫学的に交差反応性であることである。【0092】 (e) (i i) 用語「実質的に同一」は、ペプチドの場合、ペプチドが、指定の比較ウィンドウにわたって、参照配列に対して、少なくとも70%の配列同一性、参照配列に対して、好ましくは80%、より好ましくは85%、もっとも好ましくは少なくとも90%または95%の配列同一性を有する配列を含むこと示す。好ましくは、最適アライメントは、Needlemanら(1970) J. Mol. Biol. 48:443の相同性アライメントアルゴリズムを用いて実施される。二つのペプチド配列が、実質的に同一であることの指標は、一つのペプチドが、第二のペプチドに対して惹起された抗体と免疫学的に反応性であることである。従って、ペプチドは、例えば、二つのペプチドが、保存的置換によってのみ異なる場合、第二のペプチドに対して実質的に同一である。「実質的に類似」であるペプチドは、同一でない残基位置が、保存的アミノ酸変化によって異なり得ることを除いて、上記のような配列を共有する。【0093】 本発明の核酸を用いて、細菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞、哺乳動物細胞、または好ましくは植物細胞のような組換え操作された細胞中で本発明のタンパク質を発現し得る。これらの細胞は、非天然条件(例えば、量、組成、位置、および/または時間における)においてタンパク質を産生する。なぜならば、これらの細胞は、そうするために人為的介入によって遺伝的に変化されているからである。【0094】 当業者は、本発明のタンパク質をコードする核酸の発現のために利用可能な多数の発現系に精通していることが予想される。原核生物または真核生物におけるタンパク質の発現について公知の種々の方法を詳細に説明することはしない。【0095】

簡単にまとめると、本発明のタンパク質をコードする単離された核酸の発現は、代表的には、例えば、DNAまたはcDNAをプロモーター(これは、構成的または誘導性のいずれかである)に作動可能に連結して、次いで、発現ベクター内に組込むことによって達成される。このベクターは、原核生物または真核生物のいずれかにおいて複製および組み込みに適合性であり得る。代表的な発現ベクターは、本発明のタンパク質をコードするDNAの発現を調節するために有用な転写ターミネーターおよび翻訳ターミネーター、開始配列、およびプロモーターを含む。クローン化遺伝子の高レベル発現を得るた

めに、最小限、転写を指向する強力なプロモーター、翻訳開始のためのリボゾーム結合部位、および転写/翻訳ターミネーターを含む発現ベクターを構築することが望ましい。当業者は、改変が、タンパク質の生物学的活性を減少させることなく本発明のタンパク質になされ得ることを認識する。いくつかの改変は、融合タンパク質への標的分子のクローニング、発現、または組み込みを容易にするためになされ得る。このような改変は、当業者に周知であり、そして例えば、開始部位を提供するためにアミノ末端に付加されたメチオニン、あるいは都合良く配置される制限部位または停止コドンもしくは精製配列を作製するためにいずれかの末端に配置されたさらなるアミノ酸配列(例えば、ポリHis)を含む。【0096】 原核生物細胞は、発現のための宿主として用いられ得る。原核生物は、種々のE. coli株によって最も頻繁に代表されるが;他の微生物株もまた用いられ得る。リボゾーム結合部位配列と共に、転写開始のためのプロモーター(必要に応じてオペレーターを伴い)を含むことが本明細書中で定義される、一般的に用いられる原核生物細胞調節配列は、 β ラクターゼ(ベニシリナーゼ)およびラクトース(lac)プロモーター系(Changら(1977) Nature 198:1056)、トリプトファン(trp)プロモーター系(Goeddelら(1980) Nucleic Acid Res. 8:4057)ならびに λ 由来P_LプロモーターおよびN遺伝子リボゾーム結合部位(Shimatakeら(1981) Nature 292:128)のような一般的に用いられるプロモーターを含む。E. coli中にトランスフェクトされたDNAベクターにおける選択マーカーの内包もまた、有用である。このようなマーカーの例としては、アンピシリン、テトラサイクリン、またはクロラムフェニコールに対する耐性を特化した遺伝子を含む。【0097】 このベクターは、適切な宿主細胞への導入を可能にするために選択される。細菌ベクターは、代表的にプラスミドまたはファージ起源である。適切な細菌細胞を、ファージベクター粒子で感染させるか、または裸のファージベクターDNAでトランスフェクトする。プラスミドベクターが用いられる場合、この細菌細胞を、プラスミドベクターDNAでトランスフェクトする。本発明のタンパク質を発現させるための発現系は、Bacillus sp. およびSalmonellaを用いたものが利用可能である(Palvaら(1983) Gene 22:229-235; Mosbachら(1983) Nature 302:543-545)。【0098】 種々の真核生物発現系(例えば、酵母、昆虫細胞株、植物細胞および動物細胞)は、当業者に公知である。本発明の配列は、これらの真核生物系において発現され得る。いくつかの実施態様において、形質転換/トランスフェクトされた植物細胞は、本発明のタンパク質の産生のための発

現系として使用される。【0099】 酵母における異種タンパク質の合成は周知である。Sherman, F. ら (1982) *Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory は、酵母においてタンパク質を生成するために利用可能な種々の方法を記載する、十分に認められた研究である。真核生物タンパク質の産生のために2つの広範に利用される酵母は、*Saccharomyces cerevisia* および *Pichia pastoris* である。*Saccharomyces* および *Pichia* における発現のためのベクター、株、およびプロトコルは、当該分野で公知であり、そして商業的供給源 (例えば、Invitrogen) から入手可能である。適切なベクターは、通常、所望に応じて、発現調節配列 (例えば、3-ホスホグリセリン酸キナーゼまたはアルコールオキシダーゼを含む、プロモーター)、および複製起点、終止配列などを有する。【0100】 本発明のタンパク質は、一旦発現されると、その細胞を溶解しそして標準的なタンパク質単離技術をその溶解物に適用することによって酵母から単離され得る。精製プロセスのモニタリングは、ウェスタンブロット技術または他の標準的なイムノアッセイ技術であるラジオイムノアッセイを用いることによって達成され得る。【0101】 本発明のタンパク質をコードする配列はまた、例えば、哺乳動物起原、昆虫起原、または植物起原の細胞培養物をトランスフェクトするのに用いるために、種々の発現ベクターに連結され得る。このベクターの生成のために有用な細胞培養物の例は哺乳動物細胞である。哺乳動物細胞系は、しばしば、単層の細胞の形態を採るが、哺乳動物細胞懸濁液もまた用いられ得る。インタクトなタンパク質を発現し得る多くの適切な宿主細胞株が、当該分野で開発されており、そしてこれらとしては、HEK293細胞株、BHK21細胞株、およびCHO細胞株が挙げられる。これらの細胞についての発現ベクターは、複製起点、プロモーター (例えば、CMVプロモーター、HSV tkプロモーター、またはpgk (ホスホグリセリン酸キナーゼプロモーター))、エンハンサーのような発現調節配列 (Queenら (1986) *Immunol. Rev.* 89:49)、ならびにリボゾーム結合部位、RNAスプライス部位、ポリアデニル化部位 (例えば、SV40ラージT Ag ポリA付加部位)、および転写終結配列のような必要なプロセシング情報部位を含み得る。本発明のタンパク質の生成のために有用な他の動物細胞は、例えば、American Type Culture Collection Catalogue of Cell Lines and Hybridomas (第7版、1992) から利用可能である。【0102】 昆虫細胞において本発明のタンパク質を発現するための適切なベクターは、通常、SF9バキュロウイルス

スに由来する。適切な昆虫細胞株は、カの幼虫、カイコ、ヨトウムシ、ガおよび *Drosophila* の細胞株 (例えば、シュナイダー細胞株 (Schneider ら (1987) *J. Embryol. Exp. Morphol.* 27:353-365を参照のこと)) を含む。【0103】 酵母を用いるように、高等動物宿主細胞または高等植物宿主細胞が用いられる場合、ポリアデニル化配列または転写ターミネーター配列は、代表的にはベクターに組込まれる。ターミネーター配列の例は、ウシ成長ホルモン遺伝子由来のポリアデニル化配列である。この転写物の正確なスプライシングのための配列もまた含まれ得る。スプライシング配列の例は、SV40由来のVP1イントロンである (Spragueら (1983) *J. Virol.* 45:773-781)。さらに、その宿主細胞における複製を調節するための遺伝子配列が、ベクター (例えば、ウシパピローマウイルス型ベクターにおいて見出されるベクター) に組込まれ得る。Saveria-Campo, M., *Bovine Papilloma Virus DNA a Eukaryotic Cloning Vector in DNA Cloning Vol. II a Practical Approach*, D. M. Glover 編, IRL Press, Arlington, Virginia 213-238頁 (1985)。【0104】 本発明の配列は、任意の目的の植物に導入され得、そして任意の植物種形質転換のために使用され得る。導入されるべき配列は、目的の特定の植物における発現のための発現カセットにおいて使用され得る。【0105】 目的の植物としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：トウモロコシ (*Zea mays*)、*Brassica* sp. (例えば、*B. napus*, *B. rapa*, *B. juncea*) (特に、種子油の供給源として有用な *Brassica* 種)、アルファルファ (*Medicago sativa*)、イネ (*Oryza sativa*)、ライムギ (*Secale cereale*)、モロコシ (*Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*)、キビ (例えば、トウジンキビ (*Pennisetum glaucum*)、キビ (*proso millet*) (*Panicum miliaceum*)、アワ (*Setaria italica*)、シコクビエ (*Echinochloa crusgalli*)、ヒマワリ (*Helianthus annuus*)、ペニバナ (*Carthamus tinctorius*)、コムギ (*Triticum aestivum*)、ダイズ (*Glycine max*)、タバコ (*Nicotiana tabacum*)、ジャガイモ (*Solanum tuberosum*)、ピーナッツ (*Arachis hypogaea*)、ワタ (*Gossypium barbadense*, *Gossypium hirsutum*)、サツマ

イモ (*Ipomoea batatas*)、キャッサバ (*Manihot esculenta*)、コーヒー (*Cofea spp.*)、ココナッツ (*Cocos nucifera*)、パイナップル (*Ananas comosus*)、カンキツ類の木 (*Citrus spp.*)、ココア (*Theobroma cacao*)、チャ (*Camellia sinensis*)、バナナ (*Musa spp.*)、アボカド (*Persea americana*)、イチジク (*Ficus casica*)、パンジロウ (*Psidium guajava*)、マンゴー (*Mangifera indica*)、オリーブ (*Olea europaea*)、パパイア (*Carica papaya*)、カシュー (*Anacardium occidentale*)、クインスランドナッツ (*macadamia*) (*Macadamia integrifolia*)、アーモンド (*Prunus amygdalus*)、テンサイ (*Beta vulgaris*)、サトウキビ (*Saccharum spp.*)、カラスムギ、オオムギ、野菜、花卉、および針葉樹。【0106】 野菜は、以下を含む：トマト (*Lycopersicon esculentum*)、レタス (例えば、*Lactuca sativa*)、緑莢インゲン (*Phaseolus vulgaris*)、ライマメ (*Phaseolus limensis*)、エンドウマメ (*Lathyrus spp.*)、および *Cucumi* 属のメンバー (例えば、キュウリ (*C. sativus*)、カンタループメロン (*C. cantalupensis*)、およびマスキメロン (*C. melo*))。花卉は、以下を含む：アザレア (*Rhododendron spp.*)、アジサイ (*Macrophylla hydrangea*)、ハイビスカス (*Hibiscus rosasanensis*)、バラ (*Rosa spp.*)、チューリップ (*Tulipa spp.*)、スイセン (*Narcissus spp.*)、ペチュニア (*Petunia hybrid a*)、カーネーション (*Dianthus caryophyllus*)、ポインセチア (*Euphorbia pulcherrima*)、およびキク。本発明を実施する際に使用され得る針葉樹は、例えば、以下を含む：マツ (例えば、テダマツ (*loblolly pine*) (*Pinus taeda*)、テダマツ (*sl ash pine*) (*Pinus elliotti*)、ボンデローサマツ (*Pinus ponderosa*)、ヨレハマツ (*Pinus contorta*)、およびモンテレーマツ (*Pinus radiata*))；ダグラスファー (*Pseudotsuga menziesii*)；アメリカツガ (*Tsuga canadensis*)；ペイトウヒ (*Picea glauca*)；アメリカスデ (*Sequoia sempervirens*)；真のモミ (*true fir*) (例え

ば、ヨーロッパモミ (*Abies amabilis*) およびバルサムモミ (*Abies balsamea*))；ならびにスギ (例えば、ベイスギ (*Thuja plicata*) およびアラスカヒノキ (*Chamaecyparis nootkatensis*))。好ましくは、本発明の植物は、農作物植物 (例えば、トウモロコシ、アルファルファ、ヒマワリ、*Brassica*、ダイズ、ワタ、ベニバナ、ピーナッツ、モロコシ、コムギ、キビ、タバコなど) であり、より好ましくはトウモロコシ植物およびダイズ植物であり、なおより好ましくはトウモロコシ植物である。【0107】 特に目的とする植物は、目的の種子を提供する穀類植物、脂肪種子植物、および根粒植物を含む。目的の種子は、穀類の種子 (例えば、トウモロコシ、コムギ、オオムギ、コメ、モロコシ、ライムギなど) を含む。脂肪種子植物は、ワタ、ダイズ、ベニバナ、ヒマワリ、*Brassica*、トウモロコシ、アルファルファ、ヤシ、ココナッツなどを含む。根粒植物は、マメおよびエンドウマメを含む。マメは、クラスタマメ、イナゴマメ、コロハ、ダイズ、ガーデンビーンズ (*garden beans*)、ササゲ、ヤエナリ、ライマメ、ソラマメ、レンズマメ、ヒヨコマメなどを含む。【0108】 本発明の RPA コード配列およびアンチセンス配列が、目的の植物における発現のための発現カセット中で提供される。このカセットは、本発明の RPA 配列に作動可能に連結された 5' 調節配列および 3' 調節配列を含む。このカセットは、その生物中へ同時形質転換される少なくとも 1 つのさらなる遺伝子を、さらに含み得る。あるいは、このさらなる遺伝子は、別の発現カセット上に提供され得る。「作動可能に連結される (連結された)」により、プロモーターと第 2 の配列との間に機能的連結が意図される。この連結において、プロモーター配列は、第 2 の配列に対応する DNA 配列の転写を開始および媒介する。一般的に、作動可能に連結されたとは、連結されている核酸配列が連続的であり、そして 2 つのタンパク質コード領域を結合する必要がある場合は、連続的でありかる同じ読み取り枠内にある。【0109】 このような発現カセットは、その調節領域の転写調節下にあるべき RNA 配列の挿入のために、複数の制限部位を伴って、提供される。この発現カセットは、選択マーカー遺伝子をさらに含み得る。【0110】 この発現カセットは、転写の 5' - 3' 方向に、転写および翻訳開始領域、本発明の RPA DNA 配列、および植物において機能的な転写および翻訳終結領域を含む。この転写開始領域、プロモーターは、その植物宿主に対してネイティブであっても、類縁であっても、外来であっても、異種であってもよい。さらに、このプロモーターは、このプロモーターは、天然の配列であってもよいし、あるいは合成配列であってもよい。「外来」によって、その転写開始領域が、その転写開始領域が導入されるネイテ

イブの植物中に見出されないことが、意図される。本明細書中で使用される場合、キメラ遺伝子は、コード配列に対して異種である転写開始領域に、作動可能に連結されたコード配列を含む。【0111】 この配列を異種プロモーターを使用して発現することが好ましくあり得るが、ネイティブのプロモーター配列が使用され得る。このような構築物は、植物または植物細胞におけるRPAの発現レベルを変化させる。従って、その植物または植物細胞の表現型は変化される。【0112】 終結領域は、転写開始領域にネイティブであってもよいし、作動可能に連結された目的のDNA配列にネイティブであってもよいし、または別の供給源に由来してもよい。便利な終結領域は、*A. tumefaciens*のTiプラスミド由来のもの（例えば、オクトピンシンターゼ終結領域およびノバリンシンターゼ終結領域）が利用可能である。また、Guerineauら（1991）*Mol. Gen. Genet.* 262:141~144; Proudfoot（1991）*Cell* 64:671~674; Sanfalconら（1991）*Genes Dev.* 5:141~149; Mogenら（1990）*Plant Cell* 2:1261~1272; Munroeら（1990）*Gene* 91:151~158; Ballasら（1989）*Nucleic Acids Res.* 17:7891~7903; およびJoshiら（1987）*Nucleic Acid Res.* 15:9627~9639を参照のこと。【0113】 適切な場合、この遺伝子は、形質転換した植物における増加した発現のために至適化され得る。すなわち、この遺伝子は、改良した発現のために、植物に好ましいコドンを使用して合成され得る。宿主主に好ましいコドン使用頻度の考察について、例えば、CampbellおよびGowri（1990）*Plant Physiol.* 92:1~11を参照のこと。植物に好ましい遺伝子を合成するための方法が、当該分野で利用可能である。例えば、米国特許第5,380,831号および同第5,436,391号、ならびにMurrayら（1989）*Nucleic Acids Res.* 17:477~498（本明細書中で参考として援用される）。【0114】 細胞性宿主における遺伝子発現を増強するための、さらなる配列改変が、公知である。これらは、擬似（spurious）ポリアデニル化シグナルをコードする配列、エキソン・イントロンスプライス部位シグナルをコードする配列、トランスポゾン様反復をコードする配列、および遺伝子発現にとって有害であり得る他のこのような十分に特徴付けられた配列を、除去することを含む。この配列のG-C含量は、所定の細胞性宿主について平均的なレベルに調節され得、このレベルは、その宿主細胞において発現された既知の遺伝子を参照することによって算定される。可能な場合、この配列は、推定ヘアピン2次mRNA構

造を回避するように改変される。【0115】 この発現カセットは、その発現カセット構築物中に5'リーダー配列をさらに含み得る。このようなリーダー配列は、翻訳を増強するように作用し得る。翻訳リーダーは、当該分野で公知であり、これらには、以下のものが挙げられる;ピコルナウイルスリーダー（例えば、EMCVリーダー（脳心筋炎ウイルス5'非コード領域）（Elroy-Steinら（1989）*PNAS USA* 86:6126~6130））;ポチウイルス（potyvirus）リーダー（例えば、TEVリーダー（タバコエッチ（Etch）ウイルス）（Allisonら、（1986）））;MDMVリーダー（トウモロコシ萎縮（Dwarf）モザイクウイルス）（Virology, 154:9~20）、およびヒト免疫グロブリン重鎖結合タンパク質（Bip）（Macejakら（1991）*Nature*, 353:90~94））;アルファルファモザイクウイルスのコードタンパク質mRNA（AMV RNA 4）由来の非翻訳リーダー（Joblingら（1987）*Nature* 325:622~625）;タバコモザイクウイルスリーダー（TMV）（Gallieら（1989）*Molecular Biology of RNA*, Cech編、(Liss, New York) 237~256頁）;およびトウモロコシ萎黄病斑（chlorotic mottle）ウイルスリーダー（MCMV）（Lommelら（1991）*Virology* 81:382~385）;Della-Cioppaら（1987）*Plant Physiology*, 84:965~968もまた参照のこと。翻訳を増強することが公知の他の方法もまた、利用され得る（例えば、イントロンなど）。【0116】 発現カセットの調製において、種々のDNAフラグメントが、適切な方向に、かつ適切なように、適切な読み枠内で、そのDNA配列を提供するように操作され得る。この目的のために、アダプターまたはリンカーを使用して、このDNAフラグメントを連結し得るか、または他の操作を含んで、簡便な制限部位、余分なDNAの除去、制限部位の除去などを提供し得る。この目的のために、インビトロ変異誘発、プライマー修復、制限処理、アニーリング、再置換（例えば、転位および転換）が含まれ得る。【0117】 本発明の配列は、任意の植物を形質転換またはトランスフェクトするために使用され得る。この様式において、遺伝的に改変された植物、植物細胞、植物組織、種子などが、入手され得る。形質転換プロトコル、および植物内へヌクレオチド配列を導入するためのプロトコルは、形質転換について標的化される植物または植物細胞の型（すなわち、単子葉または双子葉）に依存して変化し得る。植物細胞内へのヌクレオチド配列の導入および引き続くその植物ゲノム内への挿入の適切な方法としては、マイクロインジェクション（Crosswayら（1986）B

iotekniques 4:320-334)、エレクトロポレーション(Riggsら(1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:5602-5606)、*Agrobacterium*媒介形質転換(Townsendら、米国特許第5,563,055号)、直接遺伝子移入(Paszkowskiら(1984) *EMBO J.* 3:2717-2722)、および銃式(ballistic)粒子加速(例えば、Sanfordら、米国特許第4,945,050号;Tomesら、米国特許第5,879,918号;Tomesら、米国特許第5,886,244号;Bidneyら、米国特許第5,932,782号;Tomesら(1995)「Direct DNA Transfer into Intact Plant Cells via Microprojectile Bombardment」*Plant Cell, Tissue, and Organ Culture: Fundamental Methods*, GambiaorgおよびPhillips編(Springer-Verlag, Berlin);およびMcCabeら(1988) *Biotechnology* 6:923-926)が挙げられる。また、以下も参照のこと:Weissingerら(1988) *Ann. Rev. Genet.* 22:421-477;Sanfordら(1987) *Particulate Science and Technology* 5:27-37(タマネギ);Christouら(1988) *Plant Physiol.* 87:671-674(ダイズ);McCabeら(1988) *Bio/Technology* 6:923-926(ダイズ);FinerおよびMcMullen(1991) *In Vitro Cell Dev. Biol.* 27P:175-182(ダイズ);Singhら(1998) *Theor. Appl. Genet.* 96:319-324(ダイズ);Dattaら(1990) *Biotechnology* 8:736-740(イネ);Kleinら(1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:4305-4309(トウモロコシ);Kleinら(1988) *Biotechnology* 6:559-563(トウモロコシ);Tomes、米国特許第5,240,855号;Buisingら、米国特許第5,322,783号および同第5,324,646号;Tomesら(1995)「Direct DNA Transfer into Intact Plant Cells via Microprojectile Bombardment」*Plant Cell, Tissue, and Organ Culture: Fundamental Methods*, Gambiaorg編(Springer-Verlag, Berlin)(トウモロコシ);Kleinら(1988) *Plant*

Physiol. 91:440-444(トウモロコシ);Frommら(1990) *Biotechnology* 8:833-839(トウモロコシ);Hooymaas-Van Slogterenら(1984) *Nature (London)* 311:763-764;Bowenら、米国特許第5,736,369号(穀類);Bytebierら(1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:5345-5349(ユリ科);DeWetら(1985) *The Experimental Manipulation of Ovule Tissues*, Chapmanら編(Longman, New York)197-209頁(花粉);Kaepplerら(1990) *Plant Cell Reports* 9:415-418およびKaepplerら(1992) *Theor. Appl. Genet.* 84:560-566(ウイスキー(whiskey)媒介形質転換);D'Halluinら(1992) *Plant Cell* 4:1495-1505(エレクトロポレーション);Liら(1993) *Plant Cell Reports* 12:250-255ならびにChristouおよびFord(1995) *Annals of Botany* 75:407-413(イネ);Osjodaら(1996) *Nature Biotechnology* 14:745-750(トウモロコシ(*Agrobacterium tumefaciens*を介する);これら全ては、本明細書中で参考として採用される。

【0118】形質転換された細胞は、従来の方法に従って、植物に生長させ得る。例えば、McCormickら(1986) *Plant Cell Reports* 5:81-84を参照のこと。次いで、これらの植物を増殖させ得、そして同じ形質転換株または異なる株のいずれかで受粉させ得、そして所望の表現型特性の構成的発現を有する生じたハイブリッドを同定し得る。2以上の世代を生長させて、その所望の表現型特性の発現が安定に維持および遺伝されることを確認し得、次いで種子を採取して、所望の表現型特性の発現が達成されていることを確認し得る。【0119】選択マーカーを発現するトランスジェニック植物は、例えば、標準的イムノブロットおよびDNA検出技術により、本発明の核酸の遺伝についてスクリーニングされ得る。トランスジェニック系統はまた、代表的に異種核酸の発現のレベルを評価される。RNAレベルでの発現が、最初に決定され、発現陽性植物が同定および定量され得る。RNA分析のための標準的技術が使用され得、そしてこの技術には異種のRNA鋳型のみを増幅するように設計されたオリゴヌクレオチドプライマーを用いるPCR増幅アッセイ、および異種核酸特異的プローブを用いる溶液ハイブリダイゼーションアッセイが含まれる。次いで、RNA陽性植物は、本発明の特異的に反応性の抗体を用いる

ウエスタンイムノブロット分析により、タンパク質発現について分析され得る。さらに標準的プロトコールに従うインサイチュハイブリダイゼーションおよび免疫細胞化学が、それぞれ異種核酸特異的ポリヌクレオチドプローブおよび抗体を用いて行われ、トランスジェニック組織内の発現部位を位置決めし得る。一般に、多数のトランスジェニック系統は、通常、最も適切な発現プロフィールを有する植物を同定および選択するため、組み込まれた核酸についてスクリーニングされる。【0120】

好ましい実施態様は、付加された異種核酸について同種接合性であるトランスジェニック植物；すなわち、2つの付加された核酸配列（染色体対のそれぞれの染色体上の同じ座に1つの遺伝子）を含むトランスジェニック植物、である。同種接合性のトランスジェニック植物は、単一の付加された異種核酸を含む異種接合性のトランスジェニック植物を性的に交配すること（自家受粉）、産生されたいくつかの種子を発芽させること、およびコントロール植物（すなわち、ネイティブの、非トランスジェニックの植物）に比較して変化したRPA発現のために作製された得られた植物を分析することにより獲得され得る。親植物の戻し交配および非トランスジェニック植物との異系交配もまた、意図される。【0121】

本発明はさらに、植物またはその部分におけるRPAレベルを調節（すなわち、増大または減少）するための方法を提供する。調節は、植物におけるRPAの総量（すなわち、その含量）および／または種々のRPAサブユニットタンパク質の割合（すなわち、その組成）を増大または減少させることによってもたらされ得る。この方法は、植物細胞を、上記の本発明のポリヌクレオチドを含む組換え発現カセットで形質転換して、形質転換された植物細胞を得る工程、植物形成条件下で、形質転換された植物細胞を増殖させる工程、および植物において、本発明のポリヌクレオチドの発現を、植物または植物の部分におけるRPA含量および／または組成を調節するに十分な時間について、誘導する工程を包含する。【0122】

いくつかの実施態様では、植物中のRPAは、インビボまたはインビトロで、遺伝子発現をアップレギュレートまたはダウンレギュレートするために単離されていないRPA遺伝子のプロモーターを変更することによって、調節され得る。いくつかの実施態様では、ネイティブなRPA遺伝子のコード領域は、コードされる酵素の活性を減少させるために、置換、付加、挿入、または欠失を通じて変更される。例えば、Kmiec, 米国特許5, 565, 350; Zarlingら, PCT/US93/03868を参照のこと。そしていくつかの実施態様では、プロモーター配列を含む単離された核酸（例えば、ベクター）は、植物細胞中にトランスフェクトされる。引き続いて、本発明のポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーターを含む植物細胞は、当業者に公知の手段（例えば、サザンブ

ロット、DNA配列決定、またはこのプロモーターおよびこの遺伝子に特異的なプライマーを使用して、かつそれから生じるアンプリコンを検出するPCR分析）によって選択される。前述の実施態様により変更または改変された植物または植物の部分は、植物形成条件下で、この植物中のRPAの含量および／または組成を調節するに十分な時間について、生長される。植物形成条件は、当該分野において周知であり、そして前述に簡潔に議論される。【0123】

一般に、含量または組成は、前述の組換え発現カセットを欠如するネイティブなコントロール植物、植物部分、または細胞に対して、少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%程度増大または減少される。本発明における調節は、発生の所望の段階まで植物が生長する間および／またはその後に生じ得る。一時的な核酸発現の調節および／または特定の組織における核酸発現の調節は、本発明のポリヌクレオチドに作動可能に連結された適切なプロモーターを、例えば、より詳細に議論（前出）されるようにセンスまたはアンチセンスの配向で用いることによって制御され得る。本発明のポリヌクレオチドの発現の誘導はまた、有効量の誘導化合物の外因的な投与によって制御され得る。これらのプロモーターからの発現を活性化する誘導性プロモーターおよび誘導化合物は、当該分野において周知である。好ましい実施態様では、RPAは、単子葉植物、特にトウモロコシにおいて調節される。【0124】

RPAが複数のタンパク質またはタンパク質複合体と相互作用する能力は、RPAがDNA代謝の複数のこれらの経路に関与し、かつ調節することを可能にする。例えば、哺乳動物の系において、RPAは、DNAポリメラーゼ α (Barunら (1997) *Biochemistry* 36:8443~8454)、p53 (Duttaら (1993) *Nature* 365:79~82)、RAD62 (Parkら (1996) *J. Biol. Chem.* 271:18996~19000)と相互作用することが示されている。【0125】

タンパク質間相互作用におけるRPAの中 (middle) サブユニットの関与もまた、示されている。このような相互作用の例には、XPAタンパク質およびRAD52との相互作用が挙げられるがこれらに限定されない (Heら (1995) *Nature* 374:566~69; Matsudaら (1995) *J. Biol. Chem.* 270:4152~57; Liら (1995) *Mol. Cell. Biol.* 15:5396~402; Parkら (1996) *J. Biol. Chem.* 271:18996~19000); およびPCNA (Shivjiら (1995) *Biochemistry* 34:5011~5017)。【0126】 同様に、酵母RPAは、DNA代謝における複数の機能に関与することが示されている (Umezura (1998) *Gene*

tics 148:989~1005)。従って、本発明のタンパク質は、DNA組換え、修復、および複製に関与する他のタンパク質を精製およびクローニングするために、リガンドとして有用であり得る。特に、トウモロコシタンパク質は、DNA代謝に関与する他のトウモロコシタンパク質を精製するに有用であり得る。例えば、本発明のRPAタンパク質は、親和性精製のために固体マトリクス（例えば、アガロースまたはナイロンビーズ）上に不溶化され得るか、またはRPA cDNAは、酵母ツーハイブリッドシステムにおけるベイト（bait）として使用され得る。この様式では、他のタンパク質が、同定および単離され得る。【0127】

以下の実施例は、例示のために提供され、そして限定のために提供されない。【0128】（実験）（実施例1：cDNAクローニング）総RNAを、ChomczynskiおよびSacchiによって記載（Chomczynskiら（1987）Anal. Biochem. 162:156）されるグアニジンイソチオシアネート/酸フェノール手順の改良を使用して、TRIzol試薬（Life Technology, Inc. Gaithersburg, MD）を用いてトウモロコシ組織から単離した。簡潔には、TRIzol試薬の添加前に、植物組織サンプルを液体窒素中で微粉碎し、次いで、乳鉢および乳棒を用いてさらにホモジナイズした。クロロホルムの添加（遠心分離を用いる）を、水相および有機層の分離のために実施した。総RNAを、イソプロピルアルコールを用いる、水相からの沈澱によって回収した。【0129】総RNAからのポリ（A）+RNAの選択を、PolyA Tractシステム（Promega Corporation, Madison, WI）を使用して実行した。簡潔には、ピオチン化したオリゴ（dT）プライマーを使用して、mRNA上の3'ポリ（A）テイルにハイブリダイズさせた。このハイブリッドを、常磁性粒子に結合したストレプトアビジンおよび磁気分離スタンド（magnetic separation stand）を使用して捕捉した。このmRNAを高いストリンジェント条件で洗浄し、そしてRnaseを含まない脱イオン水によって溶出した。【0130】cDNAの合成を実行し、そして一方向性の（unidirectional）cDNAライブラリーを、SuperScript Plasmidシステム（Life Technology, Inc. Gaithersburg, MD）を使用して実行した。cDNAの第1鎖を、Not I部位を含むオリゴ（dT）プライマーをプライムすることによって合成した。この反応を、SuperScript Reverse Transcriptase IIによって、45℃で触媒した。cDNAの第2鎖を、 α -³²P-dCTPで標識し、そして500塩基対よりも小さな分子の部分および連結されていないアダプターを、Se

phacryl-S400クロマトグラフィーによって除去した。この選択されたcDNA分子を、pSPOR T1参照ベクターのNot IおよびSal I部位の間に連結した。【0131】個々のコロニーを拾い上げ、そしてDNAを、M13正方向プライマーおよびM13逆方向プライマーを用いるPCRによって、またはプラスミドミニプレップ単離によってかのいずれかで調製した。全てのcDNAクローンを、M134逆方向プライマーを使用して配列決定した。【0132】RPA大サブユニット（ZmRPALSH）についての2つのトウモロコシホモログが単離されている。この遺伝子は、以下の表1に示されるように、2つの異なる染色体にマッピングされる。2つのホモログについてのアミノ酸配列およびヌクレオチド配列を、配列番号1~4に示す。表1 2つの異なる染色体へのトウモロコシRPA大サブユニット遺伝子のマッピング 【0133】【表1】

クローンID	染色体番号	ホモログ
CBPBS68	c9	ZmRPALSH1
CCRB783	c9	ZmRPALSH1
CDPGS47	c9	ZmRPALSH1
CHCLE65	c9	ZmRPALSH1
CJLPL35	c9	ZmRPALSH1
COMGE67	c9	ZmRPALSH1
CBAAX06	c9	ZmRPALSH2
CDPGS46	c9	ZmRPALSH2
CERAG93	c9	ZmRPALSH2
COMFY67	c9	ZmRPALSH2

トウモロコシRPA大サブユニットについての2つの異なるコンティグを形成する10個のESTを、マッピング実験のためにプローブとして使用した。各々のコンティグは、RPALSに対する1つのトウモロコシホモログを表す。【0134】RPA中サブユニット（ZmRPAMSH）についての7個のトウモロコシホモログが、単離されている。これらの遺伝子は、以下の表2に示されるように、第5染色体にマッピングされる。この7個のホモログのヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を、配列番号11~22に示す。表2 真核生物複製タンパク質A中サブユニットのトウモロコシホモログ 【0135】【表2】

クローンID	ホモログ	プライマー	マッピング位置
CCRBK63	ZmRPAMSH-1	P0026	C5
CGEJZ26	ZmRPAMSH-2	P0002	TBD
CGEVI74	ZmRPAMSH-3	P0002	TBD
CHSBX01	ZmRPAMSH-4	P0118	C5
CDME04	ZmRPAMSH-5	P0114	C5
CRTBB78	ZmRPAMSH-6	P0041	C5
CVRAP89	ZmRPAMSH-7	P0037	C5

TBD=決定されるべきである。【0136】（

実施例2：トランスジェニック植物の形質転換および再生) 温室ドナー植物に由来する未成熟なトウモロコシ胚を、病原体誘導性プロモーターに作動可能に連結された、本発明のRPAアンチセンス配列を含むプラスミド(図2)、および除草剤Bialaphosに対する抵抗性を付与する選択マーカー遺伝子PAT(Wohllebenら(1998) Gene 70:25~37)を含むプラスミドでボンバードする。形質転換を以下の通りに実行する。全ての培地レシピは、添付物中にある。

【0137】 (標的組織の調製) 穂を、30% Chlorox bleachおよび0.5% Micro界面活性剤で20分間表面滅菌し、そして滅菌水で2回リンスする。未成熟胚を切り出し、そして560Y培地において、4時間、胚軸側を下に配置し(胚盤側を上)

(1プレートあたり25の胚)、次いで、ボンバードメントのための調製において、2.5cmの標的域内に整列させる。【0138】 (DNAの調製) ユビキチンプロモーターに作動可能に連結された本発明のRPA配列を含むプラスミドベクターを作製する。このプラスミドDNAおよびRAT選択マーカーを含むプラスミドDNAを、以下のようなCaCl₂沈殿手順を使用し

て、1.1μm(平均直径)のタングステンペレット上に沈殿させる：水中の100μlの調製したタングステン粒子 Tris EDTA緩衝液中の10μl(1μg)のDNA(全1μg) 100μlの2.5M CaCl₂ 10μlの0.1M スペルミジン。【0139】 各試薬を、マルチチューブボルテックス上に維持しながら、タングステン粒子懸濁物に逐次的に添加する。最終混合物を短時間超音波処理し、そして一定のボルテックス下で10分間インキュベートさせる。沈殿期間の後、このチューブを短時間遠心分離し、液体を除去し、500mlの100%エタノールで洗浄し、そして30秒間遠心分離する。再度、この液体を除去し、そして105μlの100%エタノールを、最終タングステン粒子ペレットに添加する。粒子銃ボンバードメントのために、タングステン/DNA粒子を短時間超音波処理し、そして10μlを、各マイクロキャリアの中心にスポットし、そしてボンバードメントの前に約2分間乾燥させる。【0140】 (粒子銃処理) サンプルペレットを、粒子銃#HE34-1または#HE34-2でレベル#4にて衝撃する。全てのサンプルは、650 PSIにて単回発射を受け、10アリコートの全てを、調製した粒子/DNAの各チューブから得る。【0141】 (後の処理) ボンバードメントの後、胚を560Y培地上に2日間維持し、次いで3mg/リットルのBialaphosを含有する560R選択培地に移し、そして2週間毎に継代する。選択の約10週間後、選択耐性カルスクロニを、288J培地に移して、植物再生を開始する。体細胞胚成熟(2~4週間)後、良く発達した体細胞胚を、発芽のために培地に移

【0142】 (後の処理) ボンバードメントの後、胚を560Y培地上に2日間維持し、次いで3mg/リットルのBialaphosを含有する560R選択培地に移し、そして2週間毎に継代する。選択の約10週間後、選択耐性カルスクロニを、288J培地に移して、植物再生を開始する。体細胞胚成熟(2~4週間)後、良く発達した体細胞胚を、発芽のために培地に移

【0143】 (後の処理) ボンバードメントの後、胚を560Y培地上に2日間維持し、次いで3mg/リットルのBialaphosを含有する560R選択培地に移し、そして2週間毎に継代する。選択の約10週間後、選択耐性カルスクロニを、288J培地に移して、植物再生を開始する。体細胞胚成熟(2~4週間)後、良く発達した体細胞胚を、発芽のために培地に移

し、そして明培養室(lighted culture room)に移す。約7~10日後、発達した植物を、植物が十分樹立されるまで7~10日間、チューブ中の272V無ホルモン培地に移す。次いで、植物を、鉢植え用土(potting soil)を含むフラット(flat)(2, 5' 鉢に等しい)中の挿入物(insert)に移し、そして生長チャンバ中で1週間生長させ、続いて、温室中でさらに1~2週間生長させ、次いで、古典的な600鉢(1.6ガロン)に移し、そして成熟度まで生長させる。植物をモニターし、そして目的のRPA遺伝子の発現を計数する。【0142】 【表3】

添付物
272V

成分	量	単位
D-I H ₂ O	950.000	MI
MS塩(GIBCO 11117-074)	4.300	G
Myo-イノシトール	0.100	G
MSビタミンストック溶液##	5.000	MI
スクロース	40.000	G
Bacto-寒天®	6.000	G

使用法：@=容量になった後に添加精練(polished) D-I H₂O中に成分を順に溶解させるpH5.6に調整pH調整後に精練D-I H₂Oを用いて容量にする滅菌および60℃まで冷却。##=0.100gのニコチン酸；0.020gのチアミンHCL；0.100gのピリドキシンHCL；および0.400gのグリシンを875.000の精練D-I H₂O中に順に溶解させる。精練D-I H₂Oで容量にする。400mlのポーションにする。チアミンHCLおよびピリドキシンHCLを暗デシケーター中におく。夾雑または沈殿がない限りは、1ヶ月間貯蔵し、次いで新鮮なストックを作製する。総容量(L)=1.00。【0143】 【表4】

288J

成分	量	単位
D-I H ₂ O	950.000	MI
MS塩	4.300	G
Myo-イノシトール	0.100	G
MSビタミンストック溶液##	5.000	MI
Zeatin 0.5mg/ml	1.000	MI
スクロース	60.000	G
Gerlrite®	3.000	G
インドール酢酸 0.5mg/ml #	2.000	MI
0.1mM アブシジン酸	1.000	MI
Bialaphos 1mg/ml #	3.000	MI

使用法：@=容量になった後に添加精練D-I H₂O中に成分を順に溶解させるpH5.6に調整pH調整後に精練D-I H₂Oを用いて容量にする滅菌および60℃まで冷却。3.5g/LのGerlriteを細胞生物学のために添加。##=100gのニコチン酸；0

Cys	Val	Val	Lys	Gly	Asn	Ala	Asp	Lys	Val	Leu	Ile	Val	Val	Lys	1654
30							95								
105							110								
120							125								
135							140								
150							160								
165							175								
180							190								
200							205								
215							220								
230							235								
240							245								
250							255								
265							270								
285							290								
300							305								
310							315								
320							325								
330							335								
340							345								
350							355								
360							365								
370							375								
380							385								
390							395								
400							405								
410							415								
420							425								
430							435								
440							445								
450							455								
460							465								
470							475								
480							485								
490							495								
500							505								
510							515								
520							525								
530							535								
540							545								
550							555								
560							565								
570							575								
580							585								
590							595								
600							605								
610							615								
620							625								
630							635								
640							645								
650							655								
660							665								
670							675								
680							685								
690							695								
700							705								
710							715								
720							725								
730							735								
740							745								
750							755								
760							765								
770							775								
780							785								
790							795								
800							805								
810							815								
820							825								
830							835								
840							845								
850							855								
860							865								
870							875								
880							885								
890							895								
900							905								
910							915								
920							925								
930							935								
940							945								
950							955								
960							965								
970							975								
980							985								
990							995								
1000							1005								

<210> 4
 <211> 617
 <212> PRT
 <213> See May.

305 310 315 320
 Thr Leu Ser Val Arg Arg Lys Ile Asp Asn Glu Thr Ile Pro Lys Arg
 325 330 335
 Asp Ile Val Val Ala Asp Asp Ser Gly Lys Thr Val Ser Ile Ser Leu
 340 345 350
 Trp Asn Asp Leu Ala Thr Thr Thr Gly Glu Glu Leu Leu Asp Met Ala
 355 360 365
 Asp Ser Ser Pro Val Val Ala Ile Lys Ser Leu Lys Val Ser Asp Phe
 370 375 380
 Gln Gly Val Ser Leu Ser Thr Val Gly Lys Ser Thr Leu Ala Ile Asn
 385 390 395
 Pro Asp Leu His Glu Ala Gln Asn Leu Lys Ser Trp Tyr Asp Ser Glu
 400 405 410
 Gly Lys Asp Thr Ser Leu Ala Pro Ile Gly Ala Glu Met Gly Ala Ala
 415 420 425
 Arg Ala Gly Gly Phe Lys Ser Thr Thr Thr Asp Arg Val Phe Leu Ser
 430 435 440
 His Ile Thr Ser Asp Pro Ala Met Gly Gln Glu Lys Pro Val Phe Phe
 445 450 455
 Ser Leu Tyr Ala Thr Ile Ser His Ile Lys Pro Asp Gln Asn Met Trp
 460 465 470
 Tyr Arg Ala Cys Lys Thr Cys Asn Lys Lys Val Thr Glu Thr Phe Gly
 475 480 485
 Ser Gly Tyr Trp Cys Glu Gly Cys Gln Lys Asn Asp Ser Glu Cys Ser
 490 495 500
 Leu Arg Tyr Ile Met Val Ile Lys Val Ser Asp Pro Thr Gly Glu Ala
 505 510 515
 Trp Phe Ser Val Phe Asn Glu His Ala Glu Lys Ile Gly Cys Ser
 520 525 530
 Ala Asp Glu Leu Asp Arg Ile Arg Lys Glu Glu Gly Asp Asp Ser Tyr
 535 540 545
 Val Leu Lys Leu Lys Glu Ala Thr Trp Val Pro His Leu Phe Arg Val
 550 555 560
 Ser Val Thr Gln His Glu Tyr Asn Asn Glu Lys Arg Gln Arg Ile Thr
 565 570 575
 Val Arg Ser Glu Ala Pro Val Glu His Ala Ala Glu Ser Lys Tyr Leu
 580 585 590
 Leu Glu Glu Ile Ala Lys Leu Thr Ala
 595 600 605
 610 615

<210> 5
 <211> 630
 <212> PRT
 <213> *Oryza sativa*

<400> 5
 Met Asp Ser Asp Ala Ala Pro Ser Val Thr Pro Gly Ala Val Ala Phe
 1 5 10 15
 Val Leu Glu Asn Ala Ser Pro Asp Ala Ala Thr Gly Val Pro Val Pro
 20 25 30
 Glu Ile Val Leu Gln Val Val Asp Leu Lys Pro Ile Gly Thr Arg Phe
 35 40 45
 Thr Phe Leu Ala Ser Asp Gly Lys Asp Lys Ile Lys Thr Met Leu Leu
 50 55 60
 Thr Gln Leu Ala Pro Glu Val Arg Ser Gly Asn Ile Gln Asn Leu Gly
 65 70 75
 Val Ile Arg Val Leu Asp Tyr Thr Cys Asn Thr Ile Gly Glu Lys Gln
 80 85 90
 Glu Lys Val Leu Ile Ile Thr Lys Leu Glu Val Val Phe Lys Ala Leu
 95 100 105
 Asp Ser Glu Ile Lys Cys Glu Ala Glu Lys Gln Glu Glu Lys Phe Ala
 110 115 120
 Ile Leu Leu Ser Pro Lys Glu Glu Ser Val Val Leu Ser Lys Pro Thr
 125 130 135
 Asn Ala Pro Pro Leu Pro Pro Val Val Leu Lys Pro Lys Gln Glu Val
 140 145 150
 Lys Ser Ala Ser Gln Ile Val Asn Glu Gln Arg Gly Asn Ala Ala Pro
 155 160 165
 Ala Ala Arg Leu Ala Met Thr Arg Arg Val His Pro Leu Ile Ser Leu
 170 175 180
 Asn Pro Tyr Gln Gly Asn Trp Ile Ile Lys Val Arg Val Thr Ser Lys
 185 190 195
 Gly Asn Leu Arg Thr Tyr Lys Asn Ala Arg Gly Glu Gly Cys Val Phe
 200 205 210
 Asn Val Glu Leu Thr Asp Val Asp Gly Thr Gln Ile Gln Ala Thr Met
 215 220 225
 Phe Asn Glu Ala Ala Lys Lys Phe Tyr Pro Met Phe Glu Leu Gly Lys
 230 235 240
 Val Tyr Tyr Ile Ser Lys Gly Ser Leu Arg Val Ala Asn Lys Gln Phe
 245 250 255
 Lys Thr Val His Asn Asp Tyr Glu Met Thr Leu Asn Glu Asn Ala Val
 260 265 270
 Val Glu Glu Ala Glu Gly Glu Thr Phe Ile Pro Gln Ile Gln Tyr Asn
 275 280 285
 Phe Val Lys Ile Asp Gln Leu Gly Pro Tyr Val Gly Gly Arg Glu Leu
 290 295 300
 Val Asp Val Ile Gly Val Val Gln Ser Val Ser Pro Thr Leu Ser Val
 305 310 315
 Arg Arg Lys Ile Asp Asn Glu Thr Ile Pro Lys Arg Asp Ile Val Val
 320 325 330
 Ala Asp Asp Ser Ser Lys Thr Val Thr Ile Ser Leu Trp Asn Asp Leu
 335 340 345
 Ala Thr Thr Thr Gly Gln Glu Leu Leu Asp Met Val Asp Ser Ala Pro
 350 355 360
 Ile Ile Ala Ile Lys Ser Leu Lys Val Ser Asp Phe Gln Gly Leu Ser
 365 370 375
 Leu Ser Thr Val Gly Arg Ser Thr Ile Val Val Asn Pro Asp Leu Pro
 380 385 390
 Glu Ala Gln Leu Arg Ala Trp Tyr Asp Ser Glu Gly Lys Gly Thr
 395 400 405
 Ser Met Ala Ser Ile Gly Ser Asp Met Gly Ala Ser Arg Val Gly Gly
 410 415 420
 Ala Arg Ser Met Tyr Ser Asp Arg Val Phe Leu Ser His Ile Thr Ser
 425 430 435
 Asp Pro Asn Leu Gly Gln Asp Lys Pro Val Phe Phe Ser Leu Asn Ala
 440 445 450
 Tyr Ile Ser Leu Ile Lys Pro Asp Gln Thr Met Trp Tyr Arg Ala Cys
 455 460 465
 Lys Thr Cys Asn Lys Lys Val Thr Glu Ala Met Gly Ser Gly Tyr Trp
 470 475 480
 Cys Glu Gly Cys Gln Lys Asn Asp Ala Glu Cys Ser Leu Arg Tyr Ile
 485 490 495
 Met Val Ile Lys Val Ser Asp Pro Thr Gly Glu Ala Trp Leu Ser Leu
 500 505 510
 515 520 525
 530 535 540

Phe Asn Asp Gln Ala Glu Arg Ile Val Gly Cys Ser Ala Asp Glu Leu
 545 550 555
 Asp Arg Ile Arg Lys Glu Glu Gly Asp Asp Ser Tyr Leu Leu Lys Leu
 560 565 570
 Lys Glu Ala Thr Trp Val Pro His Leu Phe Arg Val Ser Val Thr Gln
 575 580 585
 Asn Glu Tyr Met Asn Glu Lys Arg Gln Arg Ile Thr Val Arg Ser Glu
 590 595 600
 Ala Pro Val Asp His Ala Ala Glu Ala Lys Tyr Met Leu Glu Glu Ile
 605 610 615
 Ala Lys Leu Thr Gly Cys
 620 625 630

<210> 6
 <211> 609
 <212> PRT
 <213> *Xenopus laevis*

<400> 6
 Met Ala Leu Pro Gln Leu Ser Glu Gly Ala Ile Ser Ala Met Leu Gly
 1 5 10
 Gly Asp Ser Ser Cys Lys Pro Thr Leu Gln Val Ile Asn Ile Arg Pro
 15 20 25
 Ile Asn Thr Gly Asn Gly Pro Pro Arg Tyr Arg Leu Met Ser Asp
 30 35 40
 Gly Leu Asn Thr Leu Ser Ser Phe Met Leu Ala Thr Gln Leu Asn Ser
 45 50 55
 Leu Val Asp Asn Asn Leu Leu Ala Thr Asn Cys Ile Cys Glu Val Ser
 60 65 70
 Arg Phe Ile Val Asn Asn Leu Lys Asp Gly Arg Arg Val Ile Ile Val
 75 80 85
 Met Glu Leu Asp Val Leu Lys Ser Ala Asp Leu Val Met Gly Lys Ile
 90 95 100
 Gly Asn Pro Gln Pro Tyr Asn Asp Gly Gln Pro Gln Pro Ala Ala Pro
 105 110 115
 Ala Pro Ala Ser Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ser Lys Leu Gln Asn Asn
 120 125 130
 Ser Ala Pro Pro Pro Ser Met Asn Arg Gly Thr Ser Lys Leu Phe Gly
 135 140 145
 Gly Gly Ser Leu Leu Asn Thr Pro Gly Gly Ser Gln Ser Lys Val Val
 150 155 160
 Pro Ile Ala Ser Leu Asn Pro Tyr Gln Ser Lys Trp Thr Val Arg Ala
 165 170 175
 Arg Val Thr Asn Lys Gly Gln Ile Arg Thr Trp Ser Asn Ser Arg Gly
 180 185 190
 Glu Gly Lys Leu Phe Ser Ile Glu Met Val Asp Glu Ser Gly Glu Ile
 195 200 205
 Arg Ala Thr Ala Phe Asn Glu Gln Ala Asp Lys Phe Phe Ser Ile Ile
 210 215 220
 Glu Val Asn Lys Val Tyr Tyr Phe Ser Lys Gly Thr Leu Lys Ile Ala
 225 230 235
 Asn Lys Gln Tyr Thr Ser Val Lys Asn Asp Tyr Glu Met Thr Phe Asn
 240 245 250
 Ser Glu Thr Ser Val Ile Pro Cys Asp Asp Ser Ala Asp Val Pro Met
 255 260 265
 Val Gln Phe Glu Phe Val Ser Ile Gly Glu Leu Glu Ser Lys Asn Lys
 270 275 280
 285 290 295

Asp Thr Val Leu Asp Ile Ile Gly Val Cys Lys Asn Val Glu Glu Val
 300 305 310
 Thr Lys Val Thr Ile Lys Ser Asn Asn Glu Glu Val Ser Lys Arg Ser
 315 320 325
 Ile His Leu Met Asp Ser Ser Gly Lys Val Val Ser Thr Thr Leu Trp
 330 335 340
 Gly Glu Asp Ala Asp Lys Phe Asp Gly Ser Arg Gln Pro Val Val Ala
 345 350 355
 Ile Lys Gly Ala Arg Leu Ser Asp Phe Gly Gly Arg Ser Leu Ser Val
 360 365 370
 Leu Ser Ser Ser Thr Val Met Ile Asn Pro Asp Ile Pro Glu Ala Phe
 375 380 385
 Lys Leu Arg Ala Trp Phe Asp Ser Glu Gly Gln Val Val Glu Gly Thr
 390 395 400
 Ser Ile Ser Glu Ser Arg Gly Gly Thr Gly Gly Gly Gly Thr Asn Thr
 405 410 415
 Trp Lys Ser Leu Leu Glu Val Lys Asn Glu Asn Leu Gly His Gly Glu
 420 425 430
 Lys Ala Asp Tyr Phe Thr Ser Val Ala Thr Ile Val Tyr Leu Arg Lys
 435 440 445
 Glu Asn Cys Leu Tyr Gln Ala Cys Pro Ser Gln Asp Cys Asn Lys Lys
 450 455 460
 Val Ile Asp Gln Gln Asn Gly Leu Phe Arg Cys Glu Lys Cys Asn Lys
 465 470 475
 Glu Phe Pro Asn Phe Lys Tyr Arg Leu Ile Leu Ser Ala Asn Ile Ala
 480 485 490
 Asp Phe Gly Glu Asn Gln Trp Ile Thr Cys Phe Gln Glu Ser Ala Glu
 495 500 505
 Ser Ile Leu Gly Gln Asn Ala Thr Tyr Leu Gly Glu Leu Lys Glu Lys
 510 515 520
 Asn Glu Glu Ala Tyr Asp Glu Val Phe Gln Asn Ala Asn Phe Arg Ser
 525 530 535
 Tyr Thr Phe Arg Ala Arg Val Lys Leu Glu Thr Tyr Asn Asp Glu Ser
 540 545 550
 Arg Ile Lys Ala Thr Ala Val Asp Val Lys Pro Val Asp His Lys Glu
 555 560 565
 Tyr Ser Arg Arg Leu Ile Met Asn Ile Arg Lys Met Ala Thr Gln Gly
 570 575 580
 Val 585 590 600 605

<210> 7
 <211> 616
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 7
 Met Val Gly Gln Leu Ser Glu Gly Ala Ile Ala Ala Ile Met Gln Lys
 1 5 10
 Gly Asp Thr Asn Ile Lys Pro Ile Leu Gln Val Ile Asn Ile Arg Pro
 15 20 25
 Ile Thr Thr Gly Asn Ser Pro Pro Arg Tyr Arg Leu Leu Met Ser Asp
 30 35 40
 Gly Leu Asn Thr Leu Ser Ser Phe Met Leu Ala Thr Gln Leu Asn Pro
 45 50 55
 Leu Val Glu Glu Glu Gln Leu Ser Ser Asn Cys Val Cys Gln Ile His
 60 65 70 75 80

Arg Phe Ile Val Asn Thr Leu Lys Asp Gly Arg Arg Val Val Ile Leu
85 90 95
Met Glu Leu Glu Val Leu Lys Ser Ala Glu Ala Val Gly Val Lys Ile
100 105 110
Gly Asn Pro Val Pro Tyr Asn Glu Gly Leu Gly Gln Pro Gln Val Ala
115 120 125
Pro Pro Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Ser Ser Arg Pro Gln Pro
130 135 140
Gln Asn Gly Ser Ser Gly Met Gly Ser Thr Val Ser Lys Ala Tyr Gly
145 150 155
Ala Ser Lys Thr Phe Gly Lys Ala Ala Gly Pro Ser Leu Ser His Thr
160 165 170
Ser Gly Gly Thr Gln Ser Lys Val Val Pro Ile Ala Ser Leu Thr Pro
175 180 185
Tyr Gln Ser Lys Trp Thr Ile Cys Ala Arg Val Thr Asn Lys Ser Gln
190 195 200
Ile Arg Thr Trp Ser Asn Ser Arg Gly Glu Gly Lys Leu Phe Ser Leu
205 210 215
Glu Leu Val Asp Glu Ser Gly Glu Ile Arg Ala Thr Ala Phe Asn Glu
220 225 230
Gln Val Asp Lys Phe Phe Pro Leu Ile Glu Val Asn Lys Val Tyr Tyr
235 240 245
Phe Ser Lys Gly Thr Leu Lys Ile Ala Asn Lys Gln Phe Thr Ala Val
250 255 260
Lys Asn Asp Tyr Glu Met Thr Phe Asn Asn Glu Thr Ser Val Met Pro
265 270 275
Cys Glu Asp Asp His His Leu Pro Thr Val Gln Phe Asp Phe Thr Gly
280 285 290
Ile Asp Asp Leu Glu Asn Lys Ser Lys Asp Ser Leu Val Asp Ile Ile
295 300 305
Gly Ile Cys Lys Ser Tyr Glu Asp Ala Thr Lys Ile Thr Val Arg Ser
310 315 320
Asn Asn Arg Glu Val Ala Lys Arg Asn Ile Tyr Leu Met Asp Thr Ser
325 330 335
Gly Lys Val Thr Ala Thr Leu Trp Gly Glu Asp Ala Asp Lys Phe
340 345 350
Asp Gly Ser Arg Gln Pro Val Leu Ala Ile Lys Gly Ala Arg Val Ser
355 360 365
Asp Phe Gly Gly Arg Ser Leu Ser Val Leu Ser Ser Thr Ile Ile
370 375 380
Ala Asn Pro Asp Ile Pro Glu Ala Tyr Lys Leu Arg Gly Trp Phe Asp
385 390 395
Ala Glu Gly Glu Ala Leu Asp Gly Val Ser Ile Ser Asp Leu Lys Ser
400 405 410
Gly Gly Val Gly Gly Ser Asn Thr Asn Trp Lys Thr Leu Tyr Glu Val
415 420 425
Lys Ser Glu Asn Leu Gly Gln Gly Asp Lys Pro Asp Tyr Phe Ser Ser
430 435 440
Val Ala Thr Val Val Tyr Leu Arg Lys Glu Asn Cys Met Tyr Gln Ala
445 450 455
Cys Pro Thr Gln Asp Cys Asn Lys Lys Val Ile Asp Gln Gln Asn Gly
460 465 470
Leu Tyr Arg Cys Glu Lys Cys Asp Thr Glu Phe Pro Asn Phe Lys Tyr
475 480 485
Arg Met Ile Leu Ser Val Asn Ile Ala Asp Phe Gln Glu Asn Gln Trp
490 495 500
Val Thr Cys Phe Gln Glu Ser Ala Glu Ala Ile Leu Gly Gln Asn Ala
505 510 515
520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600

<210> 0
<211> 603
<212> FRT
<213> *Drosophila melanogaster*

<400> 8
Met Val Leu Ala Ser Leu Ser Thr Gly Val Ile Ala Arg Ile Met His
1 10 15
Gly Glu Val Val Asp Ala Pro Val Leu Gln Ile Leu Ala Ile Lys Lys
20 25 30
Ile Asn Ser Ala Ala Asp Ser Glu Arg Tyr Arg Ile Leu Ile Ser Asp
35 40 45
Gly Lys Tyr Phe Asn Ser Tyr Ala Met Leu Ala Ser Gln Leu Asn Val
50 55 60
Met Gln His Asn Gly Glu Leu Glu Phe Thr Ile Val Gln Leu Asp
65 70 75
Lys Tyr Val Thr Ser Leu Val Gly Lys Asp Gly Ala Gly Lys Arg Val
80 85 90
Leu Ile Ile Ser Glu Leu Thr Val Val Asn Pro Gly Ala Glu Val Lys
95 100 105
Ser Lys Ile Gly Glu Pro Val Thr Tyr Glu Asn Ala Ala Lys Gln Asp
110 115 120
Leu Ala Pro Lys Pro Ala Val Thr Ser Asn Ser Lys Pro Ile Ala Lys
125 130 135
Lys Glu Pro Ser His Asn Asn Asn Asn Ile Val Met Asn Ser Ser
140 145 150
Ile Asn Ser Gly Met Thr His Pro Ile Ser Ser Leu Ser Pro Tyr Gln
155 160 165
Asn Lys Trp Val Ile Lys Ala Arg Val Thr Ser Lys Ser Gly Ile Arg
170 175 180
Thr Trp Ser Asn Ala Arg Gly Glu Gly Lys Leu Phe Ser Met Asp Leu
185 190 195
Met Asp Glu Ser Gly Glu Ile Arg Ala Thr Ala Phe Lys Glu Gln Cys
200 205 210
Asp Lys Phe Tyr Asp Leu Ile Gln Val Asp Ser Val Tyr Tyr Ile Ser
215 220 225
Lys Cys Gln Leu Lys Pro Ala Asn Lys Gln Tyr Ser Ser Leu Asn Asn
230 235 240
Ala Tyr Glu Met Thr Phe Ser Gly Glu Thr Val Val Gln Leu Cys Glu
245 250 255
Asp Thr Asp Asp Asp Pro Ile Pro Glu Ile Lys Tyr Asn Leu Val Pro
260 265 270
Ile Ser Asp Val Ser Gly Met Glu Asn Lys Ala Ala Val Asp Thr Ile
275 280 285
Gly Ile Cys Lys Glu Val Gly Glu Leu Gln Ser Phe Val Ala Arg Thr
290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600

305 310 315 320
Thr Asn Lys Glu Phe Lys Arg Asp Ile Thr Leu Val Asp Met Ser
325 330 335
Asn Ser Ala Ile Ser Leu Thr Leu Trp Gly Asp Asp Ala Val Asn Phe
340 345 350
Asp Gly His Val Gln Pro Val Ile Leu Val Lys Gly Thr Arg Ile Asn
355 360 365
Gln Phe Asn Gly Gly Lys Ser Leu Ser Leu Gly Gly Gly Ser Ile Met
370 375 380
Lys Ile Asn Pro Asp Ile Pro Glu Ala His Lys Leu Arg Gly Trp Phe
385 390 395
Asp Asn Gly Gly Gly Asp Ser Val Ala Asn Met Val Ser Ala Arg Thr
400 405 410
Gly Gly Gly Ser Phe Ser Thr Glu Trp Met Thr Leu Lys Asp Ala Arg
415 420 425
Ala Arg Asn Leu Gly Ser Gly Asp Lys Pro Asp Tyr Phe Gln Cys Lys
430 435 440
Ala Val Val His Ile Val Lys Gln Glu Asn Ala Phe Tyr Arg Ala Cys
445 450 455
Pro Gln Ser Asp Cys Asn Lys Lys Val Val Asp Glu Gly Asn Asp Gln
460 465 470
His Arg Cys Glu Lys Cys Asn Ala Leu Phe Pro Asn Phe Lys Tyr Arg
475 480 485
Leu Leu Ile Asn Met Ser Ile Gly Asp Trp Thr Ser Asn Arg Trp Val
490 495 500
Ser Ser Phe Asn Glu Val Gly Glu Gln Leu Leu Gly His Thr Ser Gln
505 510 515
Glu Val Gly Glu Ala Leu Glu Asn Asp Pro Ala Lys Ala Glu Gln Ile
520 525 530
Phe Ser Ala Leu Asn Phe Thr Ser His Ile Phe Lys Leu Arg Cys Lys
535 540 545
Asn Glu Val Tyr Gly Asp Met Thr Arg Asn Lys Leu Thr Val Gln Ser
550 555 560
Val Ala Pro Ile Asn His Lys Glu Tyr Asn Lys His Leu Leu Lys Glu
565 570 575
Leu Gln Glu Leu Thr Gly Ile Gly Ser Ser Asn
580 585 590 595 600

<210> 9
<211> 609
<212> FRT
<213> *Schizosaccharomyces pombe*

<400> 9
Met Ala Glu Arg Leu Ser Val Gly Ala Leu Arg Ile Ile Asn Thr Ser
1 5 10 15
Asp Ala Ser Ser Phe Pro Pro Asn Pro Ile Leu Gln Val Leu Thr Val
20 25 30
Lys Glu Leu Asn Ser Asn Pro Thr Ser Gly Ala Pro Lys Arg Tyr Arg
35 40 45
Val Val Leu Ser Asp Ser Ile Asn Tyr Ala Gln Ser Met Leu Ser Thr
50 55 60
Gln Leu Asn His Leu Val Ala Glu Asn Lys Leu Gln Lys Gly Ala Phe
65 70 75
Val Gln Leu Thr Gln Phe Thr Val Asn Val Met Lys Glu Arg Lys Ile
80 85 85 90 95 100
Leu Ile Val Leu Gly Leu Asn Val Leu Thr Glu Leu Gly Val Met Asp

105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600
Lys Ile Gly Asn Pro Ala Gly Leu Glu Thr Val Asp Ala Leu Arg Gln
115 120 125
Gln Gln Asn Glu Gln Asn Asn Ala Ser Ala Pro Arg Thr Gly Ile Ser
130 135 140
Phe Ser Thr Asn Ser Phe Tyr Gly Asn Asn Ala Ala Thr Ala Pro
145 150 155
Ala Pro Pro Pro Met Met Lys Lys Pro Ala Ala Pro Asn Ser Leu
160 165 170
Thr Ile Ile Tyr Pro Ile Glu Gly Leu Ser Pro Tyr Gln Asn Lys Trp
175 180 185
Thr Ile Arg Ala Arg Val Thr Asn Lys Ser Glu Val Lys His Trp His
190 195 200
Asn Gln Arg Gly Glu Gly Lys Leu Phe Ser Val Asn Leu Leu Asp Glu
205 210 215
Ser Gly Glu Ile Arg Ala Thr Gly Phe Asn Asp Gln Val Asp Ala Phe
220 225 230
Tyr Asp Ile Leu Gln Glu Gly Ser Val Tyr Tyr Ile Ser Arg Cys Arg
235 240 245
Val Asn Ile Ala Lys Lys Gln Tyr Thr Asn Val Gln Asn Glu Tyr Glu
250 255 260
Leu Met Phe Glu Arg Asp Thr Glu Ile Arg Lys Ala Glu Asp Gln Thr
265 270 275
Ala Val Pro Val Ala Lys Phe Ser Phe Val Ser Leu Gln Glu Val Gly
280 285 290
Asp Val Ala Lys Asp Ala Val Ile Asp Val Ile Gly Val Leu Gln Asn
295 300 305
Val Gly Pro Val Gln Gln Ile Thr Ser Arg Ala Thr Ser Arg Gly Phe
310 315 320
Asp Lys Arg Asp Ile Thr Ile Val Asp Gln Thr Gly Tyr Glu Met Arg
325 330 335
Val Thr Leu Tip Gly Lys Thr Ala Ile Glu Phe Ser Val Ser Glu Glu
340 345 350
Ser Ile Leu Ala Phe Lys Gly Val Lys Val Asn Asp Phe Gln Gly Arg
355 360 365
Ser Leu Ser Met Leu Thr Ser Ser Thr Met Ser Val Asp Pro Asp Ile
370 375 380
Gln Glu Ser His Leu Leu Lys Gly Trp Tyr Ser Asp Gly Gln Gly Arg Gly
385 390 395
Gln Glu Phe Ala Lys His Ser Val Ile Ser Asp Thr Leu Ser Thr Thr
400 405 410
Gly Arg Ser Ala Glu Arg Lys Asn Ile Ala Glu Val Gln Ala Glu His
415 420 425
Leu Gly Met Ser Glu Thr Pro Asp Tyr Phe Ser Leu Lys Gly Thr Ile
430 435 440
Val Tyr Ile Arg Lys Lys Asn Val Ser Tyr Pro Ala Cys Pro Ala Ala
445 450 455
Asp Cys Asn Lys Lys Val Phe Asp Gln Gly Ser Trp Arg Cys Glu
460 465 470
Lys Cys Asn Lys Glu Tyr Asp Ala Pro Gln Tyr Arg Tyr Ile Ile Thr
475 480 485
Ile Ala Val Gly Asp His Thr Gly Gln Leu Trp Leu Asn Val Phe Asp
490 495 500
Asp Val Gly Lys Leu Ile Met His Lys Thr Ala Asp Glu Leu Asn Asp
505 510 515
Leu Gln Glu Asn Asp Glu Asn Ala Phe Met Asn Cys Met Ala Glu Ala
520 525 530
535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600

Cys Tyr Met Pro Tyr Ile Phe Gln Cys Arg Ala Lys Gln Asp Asn Phe
565 570 575
Lys Gly Glu Met Arg Val Arg Tyr Thr Val Met Ser Ile Asn Gln Met
580 585
Asp Trp Lys Glu Glu Ser Lys Arg Leu Ile Asn Phe Ile Glu Ser Ala
590 600 605
Gln

<210> 10
<211> 621
<212> PRT
<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 10
Met Ser Ser Val Gln Leu Ser Arg Gly Asp Phe His Ser Ile Phe Thr
1 15
Asn Lys Gln Arg Tyr Asp Asn Pro Thr Gly Gly Val Tyr Gln Val Tyr
20 25
Asn Thr Arg Lys Ser Asp Gly Ala Asn Ser Asn Arg Lys Asn Leu Ile
35 40 45
Met Ile Ser Asp Gly Ile Tyr His Met Lys Ala Leu Leu Arg Asn Gln
50 55 60
Ala Ala Ser Lys Phe Gln Ser Met Glu Leu Gln Arg Gly Asp Ile Ile
65 70 75 80
Arg Val Ile Ile Ala Glu Pro Ala Ile Val Arg Glu Arg Lys Lys Tyr
85 90 95
Val Leu Leu Val Asp Asp Phe Glu Leu Val Gln Ser Arg Ala Asp Met
100 105 110
Val Asn Gln Thr Ser Thr Phe Leu Asp Asn Tyr Phe Ser Glu His Pro
115 120 125
Asn Glu Thr Leu Lys Asp Gly Asp Ile Thr Asp Ser Gly Asn Val Ala
130 135 140
Asn Gln Thr Asn Ala Ser Asn Ala Gly Val Pro Arg Met Leu His Ser
145 150 155 160
Asn Ser Asn Leu Asn Ala Asn Glu Arg Lys Phe Ala Asn Glu Asn Pro
165 170 175
Asn Ser Gln Lys Thr Arg Pro Ile Phe Ala Ile Glu Gln Leu Ser Pro
180 185 190
Tyr Gln Asn Val Trp Thr Ile Lys Ala Arg Val Ser Tyr Lys Gly Glu
195 200 205
Ile Lys Thr Trp His Asn Gln Arg Gly Asp Gly Lys Leu Phe Asn Val
210 215 220
Asn Phe Leu Asp Thr Ser Gly Glu Ile Arg Ala Thr Ala Phe Asn Asp
225 230 235
Phe Ala Thr Lys Phe Asn Glu Ile Leu Gln Glu Gly Lys Val Tyr Tyr
240 245 250
Val Ser Lys Ala Lys Leu Gln Pro Ala Lys Pro Gln Phe Thr Asn Leu
255 260 265
Thr His Pro Tyr Glu Leu Asn Leu Asp Arg Asp Thr Val Ile Glu Glu
270 275 280
Cys Phe Asp Glu Ser Asn Val Pro Lys Thr His Phe Asn Phe Ile Lys
285 290 300
Leu Asp Ala Ile Gln Asn Gln Glu Val Asn Ser Asn Val Asp Val Leu
305 310 315 320
Gly Ile Ile Gln Thr Ile Asn Pro His Phe Glu Leu Thr Ser Arg Ala
325 330 335

Gly Lys Lys Phe Asp Arg Arg Asp Ile Thr Ile Val Asp Asp Ser Gly
340 345 350
Phe Ser Ile Ser Val Gly Leu Trp Asn Gln Gln Ala Leu Asp Phe Asn
355 360 365
Leu Pro Glu Gly Ser Val Ala Ala Ile Lys Gly Val Arg Val Thr Asp
370 375 380
Phe Gly Gly Lys Ser Leu Ser Met Gly Phe Ser Ser Thr Leu Ile Pro
385 390 395
Asn Pro Glu Ile Pro Glu Ala Tyr Ala Leu Lys Gly Trp Tyr Asp Ser
400 405 410
Lys Gly Arg Asn Ala Asn Phe Ile Thr Leu Lys Gln Glu Pro Gly Met
415 420 425
Gly Gly Gln Ser Ala Ala Ser Leu Thr Lys Phe Ile Ala Gln Arg Ile
430 435 440
Thr Ile Ala Arg Ala Gln Ala Gln Asn Leu Gly Arg Ser Glu Lys Gly
445 450 455
Asp Phe Phe Ser Val Lys Ala Ala Ile Ser Phe Leu Lys Val Asp Asn
460 465 470
Phe Ala Tyr Pro Ala Cys Ser Asn Glu Asn Cys Asn Lys Lys Val Leu
475 480 485
Glu Gln Pro Asp Gly Thr Trp Arg Cys Glu Lys Cys Arg Thr Asn Asn
490 495 500
Ala Arg Pro Asn Trp Arg Tyr Ile Leu Thr Ile Ser Ile Ile Asp Glu
505 510 515
Thr Asn Gln Leu Trp Leu Thr Leu Phe Asp Asp Gln Ala Lys Gln Leu
520 525 530
Leu Gly Val Asp Ala Asn Thr Leu Met Ser Leu Lys Glu Glu Asp Pro
535 540 545
Asn Glu Phe Thr Lys Ile Thr Gln Ser Ile Gln Met Asn Glu Tyr Asp
550 555 560
Phe Arg Ile Arg Ala Arg Glu Thr Tyr Asn Asp Gln Ser Arg Ile
565 570 575
Arg Tyr Thr Val Ala Asn Leu His Ser Leu Asn Tyr Arg Ala Glu Ala
580 585 590
Asp Tyr Leu Ala Asp Glu Leu Ser Lys Ala Leu Leu Ala
600 605 610 620

<210> 11
<211> 1124
<212> DNA
<213> Saccharomyces cerevisiae

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)...(6)
<223> Meize RPA Middle Subunit Homologue-1

<221> CDS
<222> (76)...(894)

<400> 11
tggagccag cgtccgagat tccctctctg gaccccgag gacatcttgc cgcacccct 60
caggtgagc ggaag atg atg cag atg agc cca acc gac ttc tgg cag tgg 131
Met Met Pro Leu Ser Gln Thr Asp Phe Ser Pro Ser 10

Gln Phe Thr Ser Ser Gln Asn Ala Ala Asp Ser Thr Thr Pro Ser
15 20 25

agc atg cgc ggc ggc tcc agc acc atg cgc ctc acc gty aag cag gtc 207
Lys Met Arg Gly Ala Ser Ser Thr Met Pro Leu Thr Val Lys Gln Val 30 35 40

gtc gac ggc cag cag tct ggc cgc ggc ggc aag ggc gct cgc ttc atc 255
Val Asp Ala Gln Gln Ser Ser Gly Thr Gly Glu Lys Gly Ala Pro Phe Ile 45 50 55 60

gtc aat ggc gtc gag atg gct aac att cga ctt gty ggg atg gtc aat 303
Val Asn Gly Val Glu Met Ala Asn Ile Arg Leu Val Gly Met Val Asn 65 70 75

gac aag gtc gag cgc agc acc gat gtc acc ttc aag ctc gac gat ggc 351
Ala Lys Val Glu Arg Thr Thr Asp Val Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr 80 85 90 95

acc ggc cgc ctc gat ttc atc aga tgg gtc aat gat gct tna gat tct 399
Thr Gly Arg Leu Asp Phe Ile Arg Trp Val Asn Asp Ala Ser Asp Ser 95 100 105 110

ttt gaa aat gct gct att cag aat ggt atg ttc att cgc gtc att gga 447
Phe Glu Thr Thr Ala Ala Ile Gln Asn Gly Met Tyr Ile Ala Val Ile Gly 110 115 120

agc ctc aag gga cgc car gag agc aag cgt gct acc gct ttc tca atc 425
Ser Leu Lys Gly Leu Gln Glu Arg Lys Arg Ala Thr Ala Phe Ser Ile 125 130 135 140

agg cct ata acc gat ttc aat gag gtt acc cgc cat ttc att cag tgc 543
Arg Pro Ile Thr Asp Phe Asn Glu Val Thr Leu His Phe Ile Gln Cys 145 150 155

ptt cgc atg cat ata gag aat att gaa tca aag gct ggc agt cct gaa 551
Val Arg Met His Ile Glu Asn Ile Glu Leu Lys Ala Gly Ser Pro Ala 160 165 170

cga aat aat tct tct atg gga gtc tca ttc tca aat gga ttc agt gaa 629
Arg Ile Ser Ser Ser Met Gly Val Ser Phe Ser Asn Gly Phe Ser Glu 175 180 185

tcc agc acc cgc acc tct ttc aat tcc agt cct gaa cgc gtc acc agc 687
Ser Ser Thr Pro Thr Ser Leu Lys Ser Ser Pro Ala Pro Val Thr Ser 190 195 200

ggg tca tcc gat acc gat cgc cgc agc cgc gtc cgc aat ttt ttt aat 735
Gly Ser Ser Asp Thr Thr Leu His Thr Gln Val Leu Asn Phe Phe Asn 205 210 215 220

gaa cca ggc aac ctc gag agt gag cat ggg gtc cag gtc gat gaa gta 783
Glu Pro Ala Asn Leu Glu Ser Glu His Gly Val His Val Asp Glu Val 225 230 235

ctc aag cgc ttc aat att ttc cgc aag aag cag atc agc gat gct att 821
Leu Lys Arg Phe Lys Leu Leu Pro Lys Lys Gln Ile Thr Asp Ala Ile 240 245 250

gat tcc aat atg gac tcc ggc gct att tcc tcc aca att gat gaa ttc 879
Arg Tyr Asn Met Asp Ser Gly Arg Leu Tyr Ser Thr Ile Asp Glu Phe 255 260 265

ccc tcc aag gaa aat caccgagatc gacgagcagc ctcgagagaa tggcaggg 924
His Tyr Lys Ala Thr 270

cctgagatc cctgagatc accaagctt ggcagctgca tctgctgctc tggagcagc 994
gctgagatc tggagcagc tctgctgctc tctgagatc tctgagatc tctgagatc 1054
cctgagatc ggcgagagaa aggcagatc tggagcagc cagagagaa aaaaaaaa 1114
aaaaaaaa 1124

<210> 12
<211> 273
<212> PRT
<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 12
Met Met Pro Leu Ser Gln Thr Asp Phe Ser Pro Ser Gln Phe Thr Ser
1 5 10 15

Ser Gln Asn Ala Ala Ala Asp Ser Thr Thr Pro Ser Lys Met Arg Gly
20 25 30
Ala Ser Ser Thr Met Pro Leu Thr Val Lys Gln Val Val Asp Ala Gln
35 40 45

Gln Ser Gly Thr Gly Glu Lys Gly Ala Pro Phe Ile Val Asn Gly Val
50 55 60
Glu Met Ala Asn Ile Arg Leu Val Gly Met Val Asn Ala Lys Val Glu
65 70 75 80

Arg Thr Thr Asp Val Thr Phe Thr Leu Asp Asp Gly Thr Gly Arg Leu
85 90 95
Asp Phe Ile Arg Trp Val Asn Asp Ala Ser Asp Ser Phe Glu Thr Ala
100 105 110

Ala Ile Gln Asn Gly Met Tyr Ile Ala Val Ile Gly Ser Leu Lys Gly
115 120 125
Leu Gln Glu Arg Lys Arg Ala Thr Ala Phe Ser Ile Arg Pro Ile Thr
130 135 140

Asp Phe Asn Glu Val Thr Leu His Phe Ile Gln Cys Val Arg Met His
145 150 155 160
Ile Glu Asn Ile Glu Leu Lys Ala Gly Ser Pro Ala Arg Ile Ser Ser
165 170 175

Ser Met Gly Val Ser Phe Ser Asn Gly Phe Ser Glu Ser Ser Thr Pro
180 185 190
Thr Ser Leu Lys Ser Ser Pro Ala Pro Val Thr Ser Gly Ser Ser Asp
195 200 205

Thr Asp Leu His Thr Gln Val Leu Asn Phe Phe Asn Glu Pro Ala Asn
210 215 220
Leu Glu Ser Glu His Gly Val His Val Asp Glu Val Leu Lys Arg Phe
225 230 235 240

Lys Leu Leu Pro Lys Lys Gln Ile Thr Asp Ala Ile Asp Tyr Asn Met
245 250 255
Asp Ser Gly Arg Leu Tyr Ser Thr Ile Asp Glu Phe His Tyr Lys Ala
260 265 270

Thr

<216> 12
 <211> 979
 <212> DNA
 <213> 2ea ways
 <220>
 <221> misc feature
 <222> (0)...(10)
 <223> Maize RPA Middle Subunit Homologue-2 and 3
 <221> CDS
 <222> (37)...(855)
 <400> 13
 ttcgggacga gctacatccc tccggtgccc gggag atg atg ccg ttg agc cca 54
 Met Met Pro Leu Ser Gln
 1 5
 acc gac ttc tgg cgg tgg ttc acc tcc tcc cag aat gcc gcc gcc 102
 Thr Asp Phe Ser Pro Ser Gln Phe Thr Ser Ser Gln Asn Ala Ala Ala
 10 15 20
 gac tcc acc acc cct tcc cag atg cgc gcc gcc tcc acc acc atg ccc 150
 Asp Ser Thr Thr Pro Ser Lys Met Arg Gly Ala Ser Ser Thr Met Pro
 25 30 35
 ctc acc cgc acc cag gtc gtc gac gcc cgc cgc cct tct gcc acc gcc gac 198
 Leu Thr Val Lys Gln Val Val Asp Ala Gln Ser Gly Thr Gly Asp
 40 45 50
 aag gcc gct acc ttc etc gtc aat gcc gac gag atg gct acc att cgc 246
 Lys Gly Ala Phe Phe Ile Val Asn Gly Val Gln Met Ala Asn Ile Arg
 55 60 65 70
 ctt ggc ggc atg gtc aat gcc aag gtc ggc cgc acc gcc gct gtc acc 294
 Leu Val Gly Met Val Asn Ala Lys Val Gln Acc Thr Thr Asp Val Thr
 75 80 85
 ttc acc ctc gac gct gcc acc gcc cgc ctc gac ttc etc aga tgg gtc 342
 Phe Thr Leu Asp Asp Gly Thr Gly Arg Leu Asp Phe Ile Arg Trp Val
 90 95 100
 aat gct gct tca gct tct ttt gaa act gct gct att cag aat ggt atg 390
 Asn Asp Ala Ser Asp Ser Phe Gln Thr Ala Ala Ile Gln Asn Gly Met
 105 110 115
 tcc att cgc gtc att gga agc ctc aag gga ctc gaa gag acc acc cct 438
 Tyr Ile Ala Val Ile Gly Ser Leu Lys Gly Leu Gln Glu Arg Lys Arg
 120 125 130
 gct acc gct ttc tcc etc acc cct ata acc gct ttc aat gag gtt acc 486
 Ala Thr Ala Phe Ser Ile Arg Pro Ile Thr Asp Phe Asn Glu Val Thr
 135 140 145 150
 ctc cat ttc att cag tct gtt cgc atg cat ata gag acc acc gaa ttc 534
 Leu His Phe Ile Gln Cys Val Arg Met His Ile Glu Asn Ile Glu Leu
 155 160 165
 aag gct gcc agt cct gca cgc att cgt tct tcc atg gga gtc tca ttc 582
 Lys Ala Gly Ser Pro Ala Arg Ile Ser Ser Ser Met Gly Val Ser Phe
 170 175 180
 tcc acc ggc ttc agt gaa tcc acc acc cgc acc tct ttc aat tcc acc 630
 Ser Asn Gly Phe Ser Gln Ser Thr Pro Thr Ser Leu Lys Ser Ser
 185 190 195
 ccc gcc acc gtc acc acc ggc ggc tcc tcc acc cct gct cgc acc acc ccc 678
 Pro Ala Pro Val Thr Ser Gly Ser Ser Asp Thr Asp Leu His Thr Gln
 200 205 210
 gtc ctc acc ttt ttt aat gaa cca gcc aac ctc gag agt gag acc ggc 726
 Val Leu Asn Phe Phe Asn Gln Pro Ala Asn Leu Glu Ser Glu His Gly
 215 220 225 230
 ggc acc gtt gct gaa gtc ttc acc cgc ttc aat ctt ttc cgc aag aag 774
 Val His Val Asp Glu Val Leu Lys Arg Phe Lys Leu Leu Pro Lys Lys
 235 240 245
 cag atc acc gct gct acc gct tcc aat atg gac tgc ggc gct ctt tcc 822
 Gln Ile Thr Asp Ala Ile Asp Tyr Asn Met Asp Ser Gly Arg Leu Tyr
 250 255 260
 tcc acc att gct gaa ttc acc tcc acc acc gct acc taccgattt gaaagccagc 875
 Ser Thr Ile Asp Glu Phe His Tyr Lys Ala Thr
 265 270
 ctcgtggaaa tggcagagga ctacgtctcca cttgtactaa accaaagtct ggaatgtcca 935
 tctgtgtgca tggatgtcat ggttgggttta tggaaacaaa aaaa 979
 <210> 14
 <211> 273
 <212> PRT
 <213> 2ea ways
 <400> 14
 Met Met Pro Leu Ser Gln Thr Asp Phe Ser Pro Ser Gln Phe Thr Ser 1
 5 10 15
 Ser Gln Asn Ala Ala Asp Ser Thr Thr Pro Ser Lys Met Arg Gly 20
 25 30
 Ala Ser Ser Thr Met Pro Leu Thr Val Lys Gln Val Val Asp Ala Gln 35
 40 45
 Gln Ser Gly Thr Gly Asp Lys Gly Ala Pro Phe Ile Val Asn Gly Val 50
 55 60
 Glu Met Ala Asn Ile Arg Leu Val Gly Met Val Asn Ala Lys Val Glu 65
 70 75 80
 Arg Thr Thr Asp Val Thr Phe Thr Leu Asp Asp Gly Thr Gly Arg Leu 85
 90 95
 Asp Phe Ile Arg Trp Val Asn Asp Ala Ser Asp Ser Phe Glu Thr Ala 100
 105 110
 Ala Ile Gln Asn Gly Met Tyr Ile Ala Val Ile Gly Ser Leu Lys Gly 115
 120 125
 Leu Gln Glu Arg Lys Arg Ala Thr Ala Phe Ser Ile Arg Pro Ile Thr 130
 135 140

Asp Phe Asn Glu Val Thr Leu His Phe Ile Gln Cys Val Arg Met His 145
 150 155
 Ile Glu Asn Ile Glu Leu Lys Ala Gly Ser Pro Ala Arg Ile Ser Ser 160
 165 170
 Ser Met Gly Val Ser Phe Ser Asn Gly Phe Ser Glu Ser Ser Thr Pro 175
 180 185
 Thr Ser Leu Lys Ser Ser Pro Ala Pro Val Thr Ser Gly Ser Ser Asp 190
 195 200
 Thr Asp Leu His Thr Gln Val Leu Asn Phe Phe Asn Glu Pro Ala Asn 205
 210 215
 Leu Glu Ser Glu His Gly Val His Val Asp Glu Val Leu Lys Arg Phe 220
 225 230
 Lys Leu Leu Pro Lys Lys Gln Ile Thr Asp Ala Ile Asp Tyr Asn Met 235
 240 245
 Asp Ser Gly Arg Leu Tyr Ser Thr Ile Asp Glu Phe His Tyr Lys Ala 250
 255 260
 Thr 265 270

<210> 15
 <211> 1051
 <212> DNA
 <213> 2ea ways

<220>
 <221> misc feature
 <222> (0)...(10)
 <223> Maize RPA Middle Subunit Homologue-4

<221> CDS
 <222> (76)...(854)

<400> 15
 tgcacccccc cgtcccaacc taccatctgc gaccccccga gaaatattgc cgtacccccc 60
 caggtgcccc ggaag atg atg ccc ttg acc cca acc gac ttc tcc ccc tcc 111
 Met Met Pro Leu Ser Gln Thr Thr Asp Phe Ser Pro Ser
 1 5 10
 cag ttc acc tcc tcc cag aat gcc gcc gcc gac tcc acc acc cct tcc 159
 Gln Phe Thr Ser Ser Ser Gln Asn Ala Ala Asp Ser Thr Thr Pro Ser
 15 20 25
 aag atg cgc gcc ggc tcc acc acc atg cgc ctc acc gtc aag cag gtc 207
 Lys Met Met Arg Gly Ala Ser Ser Thr Met Pro Leu Thr Val Lys Gln Val
 30 35 40
 gtc gac gcc cgc cag tcc gcc acc gcc gcc aag gcc gct acc ttc atc 255
 Val Asp Ala Gln Gln Ser Gly Thr Gly Glu Lys Gly Ala Pro Phe Ile
 45 50 55 60
 gtc aat gcc gtc gag atg gct aac att cga ctt gtc ggc atg gtc aat 303
 Val Asn Gly Val Glu Met Ala Asn Ile Arg Leu Val Thr Gly Met Val Asn
 65 70 75
 gcc aag gtc gag cga acc acc gct gtc acc ttc acc ctc gac gcc ggc 351
 Ala Lys Val Glu Arg Thr Thr Asp Val Thr Phe Thr Leu Asp Asp Gly
 80 85 90
 acc gcc cgc ctc gac ttc acc acc aga tgg gtc aat gct gct tca gct tct 399
 Thr Gly Arg Leu Asp Phe Ile Arg Trp Val Asn Asp Ala Ser Asp Ser
 95 100 105
 ttt gaa acc gct gct att cag aat ggt atg tcc att gcc gtc ttt gga 447
 Phe Glu Thr Ala Ala Ile Gln Asn Gly Met Tyr Ile Ala Val Ile Gly
 110 115 120
 acc ctc aag gga ctc gaa gag agc acc gct acc gct ttc tcc atc 495
 Ser Leu Lys Gly Leu Gln Glu Arg Lys Arg Ala Thr Ala Phe Ser Ile
 125 130 135 140
 acc cct ata acc gct ttc aat ggc att acc cgc cct ctc att cag tct 543
 Arg Pro Ile Thr Asp Phe Asn Glu Val Thr Leu His Phe Ile Gln Cys
 145 150 155
 gtc cgc atg cat ata gag acc acc gaa tta aag gct gcc acc cct gca 591
 Val Arg Met His Ile Glu Asn Thr Glu Leu Lys Ala Gly Ser Pro Ala
 160 165 170
 acc atc acc tct cct atg gga gtc tca ttc tcc acc gga ttc acc gaa 639
 Arg Ile Asn Ser Ser Met Gly Val Ser Phe Ser Asn Gly Phe Ser Glu
 175 180 185
 tcc acc acc cgc acc tct ttc aat tcc acc gcc gaa cgc gtc acc acc 687
 Ser Ser Thr Pro Thr Ser Leu Lys Ser Ser Pro Ala Pro Val Thr Ser
 190 195 200
 ggc tcc tcc gct acc gct ttc acc acc acc cgc gtc ctc acc ttt ttt acc 735
 Gly Ser Ser Asp Thr Asp Leu His Thr Gln Val Leu Asn Phe Phe Asn
 205 210 215 220
 gaa cca gcc acc ctc gac agt gag acc ggc gtc cgc acc gct gaa gta 783
 Glu Pro Ala Asn Leu Glu Ser Glu His Gly Val His Val Asp Glu Val
 225 230 235
 ctc acc cgc ttc aat cct ttc cgc aag aag cag acc cgc gct gct att 831
 Leu Lys Arg Phe Lys Leu Leu Pro Lys Lys Gln Ile Thr Asp Ala Ile
 240 245 250
 gct tcc aat atg gac tgg ggc gct ctt tcc tca acc att gct gaa ttc 879
 Asp Tyr Asn Met Asp Ser Gly Arg Leu Tyr Ser Thr Ile Asp Glu Phe
 255 260 265
 acc tcc acc gca acc taccgattt gaaagtcgc ctcgtggaaa tggcagagga 939
 His Tyr Lys Ala Thr
 270
 ctacgtctcca cttgtactaa accaaagtct ggaatgtcca tctgtgtgca tggatgtcat 954
 tctgtgtgca tggatgtcat ggttgggttta tggaaacaaa aaaa 1051

<210> 16
 <211> 273
 <212> PRT
 <213> 2ea ways

59

acg acc gat gtc acc ttc acg ctc gat gat ggc acc ggc cgc ctc gat 341
 Thr Thr Asp Val Thr Phe Thr Leu Asp Asp Gly Thr Gly Arg Leu Asp
 85 90 95
 ttc atc aga tgg gtc act gat ggt tca gat tct ttt gaa act ggt ggt 393
 Phe Ile Arg Trp Val Asn Asp Ala Ser Asp Ser Phe Gly Thr Ala Ala
 100 105 110
 att cag aat ggt atg tac att ggc gtc att ggc ggc ctc aag ggc atg 441
 Ile Glu Asn Gly Met Tyr Ile Ala Val Ile Gly Ser Leu Lys Gly Leu
 115 120 125
 cca gag agg aag cgt gct act gct ttc tca atc atc ggc cct ata acc gat 489
 Glu Glu Arg Lys Arg Ala Thr Ala Phe Ser Ile Arg Pro Ile Thr Asp
 130 135 140 145
 ttc aat gag gtt acg cgt cct ttc att cag tgt gtt cgg atg cat ata 537
 Phe Asn Glu Val Thr Leu His Phe Ile Glu Cys Val Arg Met His Ile
 150 155 160
 gag aac act gaa tta aag gct ggc agt cct gca cga atc aat tct tct 595
 Glu Asn Thr Glu Leu Lys Ala Gly Ser Pro Ala Arg Ile Asn Ser Ser
 165 170 175
 atg ggc gtc tca ttc tca aat ggc ttc agt gaa tca atc acc cag acc 633
 Met Gly Val Ser Phe Ser Asn Gly Phe Ser Glu Ser Thr Thr Thr Thr
 180 185 190
 tct ttg aac tcc agt ccc gaa cgc gtc acc agc ggc tca tcc gat act 681
 Ser Leu Lys Ser Ser Pro Ala Pro Val Thr Ser Gly Ser Ser Asp Thr
 195 200 205
 gat ctg ccc acg cag gtc atg aat ttt ttt aat gaa oca ggc aac ctc 729
 Asp Leu His Thr Glu Val Leu Asn Phe Phe Asn Glu Pro Ala Asn Leu
 210 215 220 225
 gag agt gag cat ggc gtc tac gtt gat gaa gta ctc aag cag ttc aac 777
 Glu Ser Glu His Gly Val His Val Asp Glu Val Leu Lys Arg Phe Lys
 230 235 240
 ctt ttg cag aag cag cag atc aag gat ggt att gat tac aat atg gat 825
 Leu Leu Pro Lys Lys Glu Ile Thr Asp Ala Ile Asp Tyr Asn Met Asp
 245 250 255
 tgg ggc cgt ctt tac tca aac att gat gaa ttc cgc tac aag gca act 873
 Ser Gly Arg Leu Tyr Ser Thr Ile Asp Glu Phe His Tyr Lys Ala Thr
 260 265 270

taacgattt gaaggtcagc ctgctggaaa tggcagagga ctaactatca ctctactaa 933
 accaagctt ggaatgtc tctgtgtc tgaatgcat gttgtgtt tgaatcatt 993
 tctctctt ctactagt gaaatgtc ctctgtgtc aactatgta ctgagctaac 1053
 taacgagaa aaaaaaaaaa 1074

<210> 20
 <211> 273
 <212> PRT

<213> Iaa nays

<400> 20
 Met Met Pro Leu Ser Glu Thr Asp Phe Ser Pro Ser Glu Phe Thr Ser 1
 5 10 15
 Ser Glu Asn Ala Ala Phe Asp Ser Thr Thr Pro Ser Lys Met Arg Gly 20
 25 30
 Ala Ser Ser Thr Met Pro Leu Thr Val Lys Glu Val Val Asn Ala Glu 35
 40 45
 Glu Ser Gly Thr Gly Glu Lys Gly Ala Phe Phe Ile Val Asn Gly Val 50
 55 60
 Glu Met Ala Asn Ile Arg Leu Val Gly Met Val Asn Ala Lys Val Glu 65
 70 75 80
 Arg Thr Thr Asp Val Thr Phe Thr Leu Asp Asp Gly Thr Gly Arg Leu 85
 90 95
 Asp Phe Ile Arg Trp Val Asn Asp Ala Ser Asp Ser Phe Glu Thr Ala 100
 105 110
 Ala Ile Glu Asn Gly Met Tyr Ile Ala Val Ile Gly Ser Leu Lys Gly 115
 120 125
 Leu Glu Glu Arg Lys Arg Ala Thr Ala Phe Ser Ile Arg Pro Ile Thr 130
 135 140
 Asp Phe Asn Glu Val Thr Leu His Phe Ile Glu Cys Val Arg Met His 145
 150 155 160
 Ile Glu Asn Thr Glu Leu Lys Ala Gly Ser Pro Ala Arg Ile Asn Ser 165
 170 175
 Ser Met Gly Val Ser Phe Ser Asn Gly Phe Ser Glu Ser Ser Thr Pro 180
 185 190
 Thr Ser Leu Lys Ser Ser Pro Ala Pro Val Thr Ser Gly Ser Ser Asp 195
 200 205
 Thr Asp Leu His Thr Glu Val Leu Asn Phe Phe Asn Glu Pro Ala Asn 210
 215 220
 Leu Glu Ser Glu His Gly Val His Val Asp Glu Val Leu Lys Arg Phe 225
 230 235 240
 Lys Leu Leu Pro Lys Lys Glu Ile Thr Asp Ala Ile Asp Tyr Asn Met 245
 250 255
 Asp Ser Gly Arg Leu Tyr Ser Thr Ile Asp Glu Phe His Tyr Lys Ala 260
 265 270
 Thr

<210> 21
 <211> 1231
 <212> DNA
 <213> Iaa nays

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)...(10)
 <223> Nucleic Acid Middle Subunit Homologue-7

<221> CDS
 <222> (15)...(1903)

<400> 21
 tccagctggc accagcggc ccagcattcc accatctggc caccggcagc cctattcttc 60
 gcaatctctc aggtgcggc gagc atg atg cgc atg agc cca acc gat ttc 111
 Met Met Pro Leu Ser Glu Thr Asp Phe

60

1 5
 tgg cgg tgg cag ctc acc tcc tcc cag aat gcc gcc gcc gac tcc acc 159
 Ser Pro Ser Glu Phe Thr Ser Ser Glu Asn Ala Ala Asp Ser Thr 25
 10 15 20
 acg cct tcc aag atg cgc ggc ggc tcc agc acc atg cgc ctc acc gtc 207
 Thr Pro Ser Lys Met Arg Gly Ala Ser Ser Thr Met Pro Leu Thr Val 30
 35 40
 aag cag gtc gtc gac ggc cag cag cgt ggc gcc gcc gag ggc gct 255
 Lys Glu Val Val Asp Ala Glu Glu Ser Gly Thr Gly Glu Lys Gly Ala 45
 50 55
 cgc ttc atc ggt aat ggc gtc gag atg gct aac att cga ctt gtc ggc 303
 Pro Phe Ile Val Asn Gly Val Glu Met Ala Asn Ile Arg Leu Val Gly 60
 65 70
 atg gtc cct gcc aag gtc gag cgc acc gat gtc acc ttc acc ctc 351
 Met Val Asn Ala Lys Val Glu Arg Thr Thr Asp Val Thr Phe Thr Leu 75
 80 85
 gcc gat gcc acc gcc cgc ctc gat ttc ctc agc tgg gtc aat gat gct 399
 Asp Asp Gly Thr Gly Arg Leu Asp Phe Ile Arg Trp Val Asn Asp Ala 90
 95 100 105
 tca gat tct ttt gaa act ggt gct att cag aat ggt atg tac att cgc 447
 Ser Asp Ser Phe Glu Thr Ala Ala Ile Glu Asn Gly Met Tyr Ile Ala 110
 115 120
 gtc att ggc gcc ctc aag ggc ctc gaa gag agc agc gct gct act gct 495
 Val Ile Gly Ser Leu Lys Gly Leu Glu Glu Arg Lys Arg Ala Thr Ala 125
 130 135
 ttc tca atc agc cct ata acc gat ttc aat gag gtt acc cgt cct ttc 543
 Phe Ser Ile Arg Pro Ile Thr Asp Phe Asn Glu Val Thr Leu His Phe 140
 145 150
 att cag tgt gtt cgg atg cat ata gag aac act gaa tta aag gct ggc 591
 Ile Glu Cys Val Arg Met His Ile Glu Asn Thr Glu Leu Lys Ala Gly 155
 160 165
 agt cct gca cys abc aat cct tct atg ggc gtc tca ttc tca aat ggc 639
 Ser Pro Ala Arg Ile Asn Ser Ser Met Gly Val Ser Phe Ser Asn Gly 170
 175 180 185
 ttc agt gaa tca agc aca cgc ata tct ttg aac tcc agt ccc gcc cgc 687
 Phe Ser Glu Ser Thr Thr Thr Ser Leu Lys Ser Ser Pro Ala Pro 190
 195 200 205
 gtc acc agc ggc tca tcc gat act gat ctc cag acc cag gtc ctc acc 735
 Val Thr Ser Gly Ser Ser Asp Thr Asp Thr Asp Thr Glu Val Leu Asn 210
 215 220
 ttt ttt aat gaa cca ggc aat ctc gag agt gag cat ggc gtc cag gtt 783
 Phe Phe Asn Glu Pro Ala Asn Leu Glu Ser Glu His Gly Val His Val 220
 225 230
 gat gaa gaa ctc aag cgc ttc aca ctt ttg cgc aag aag cag ctc acc 831
 Asp Glu Val Leu Lys Arg Phe Lys Leu Leu Pro Lys Lys Glu Ile Thr 235
 240 245
 gat gct att gat tac act atg gat tgg ggc ggt ctt tac tca aca att 879
 Asp Ala Ile Asp Tyr Asn Met Asp Ser Gly Arg Leu Tyr Ser Thr Ile 250
 255 260 265
 gat gaa ttc tac tac aag gca act taacgattt gaaggtcagc ctgctggaaa 933
 Asp Glu Phe His Tyr Lys Ala Thr 270

tggcagagga ctaactatca ctctactaa accaagctt ggaatgtc tctgtgtc 993
 tgaatgcat gttgtgtt tgaatcatt tctctctt ctactagt gaaatgtc ctctgtgtc 1053
 ctctgtgtc taactatga ctgagctaac aacagagga tgaatgtc gacagcatt 1113
 tgaatgtc ctgagctg ctgagctg ctgagctg tgaatgtc tgaatgtc gttgtgtc 1173
 ttcagctg aacagagga gatttttca aacagagga aacagagga aacagagga 1231

<210> 22
 <211> 273
 <212> PRT
 <213> Iaa nays

<400> 22
 Met Met Pro Leu Ser Glu Thr Asp Phe Ser Pro Ser Glu Phe Thr Ser 1
 5 10 15
 Ser Glu Asn Ala Ala Ala Asp Ser Thr Thr Pro Ser Lys Met Arg Gly 20
 25 30
 Ala Ser Ser Thr Met Pro Leu Thr Val Lys Glu Val Val Asp Ala Glu 35
 40 45
 Glu Ser Gly Thr Gly Glu Lys Gly Ala Pro Phe Ile Val Asn Gly Val 50
 55 60
 Glu Met Ala Asn Ile Arg Leu Val Gly Met Val Asn Ala Lys Val Glu 65
 70 75 80
 Arg Thr Thr Asp Val Thr Phe Thr Leu Asp Asp Gly Thr Gly Arg Leu 85
 90 95
 Asp Phe Ile Arg Trp Val Asn Asp Ala Ser Asp Ser Phe Glu Thr Ala 100
 105 110
 Ala Ile Glu Asn Gly Met Tyr Ile Ala Val Ile Gly Ser Leu Lys Gly 115
 120 125
 Leu Glu Glu Arg Lys Arg Ala Thr Ala Phe Ser Ile Arg Pro Ile Thr 130
 135 140
 Asp Phe Asn Glu Val Thr Leu His Phe Ile Glu Cys Val Arg Met His 145
 150 155 160
 Ile Glu Asn Thr Glu Leu Lys Ala Gly Ser Pro Ala Arg Ile Asn Ser 165
 170 175
 Ser Met Gly Val Ser Phe Ser Asn Gly Phe Ser Glu Ser Ser Thr Pro 180
 185 190
 Thr Ser Leu Lys Ser Ser Pro Ala Pro Val Thr Ser Gly Ser Ser Asp 195
 200 205
 Thr Asp Leu His Thr Glu Val Leu Asn Phe Phe Asn Glu Pro Ala Asn 210
 215 220
 Leu Glu Ser Glu His Gly Val His Val Asp Glu Val Leu Lys Arg Phe 225
 230 235 240
 Lys Leu Leu Pro Lys Lys Glu Ile Thr Asp Ala Ile Asp Tyr Asn Met 245
 250 255
 Asp Ser Gly Arg Leu Tyr Ser Thr Ile Asp Glu Phe His Tyr Lys Ala 260
 265 270
 Thr

is由来のRPA大サブユニット (Rfa Xenl
a、配列番号6)、およびOryza sativa由
来のRPA大サブユニット (O24183、配列番号5
) に対するアミノ酸配列を、初期設定パラメータを利用
したGCG PileUpプログラムを用いて、トウモ
ロコシのRPA L S相同体1 (ZMRPALSH1、配
列番号2) および相同体2 (ZMRPALSH2、配列
番号4) と比較した。【図2】 図2は、トウモロコ
シのRPA ラージまたは中サブユニットアンチセンス構
築物の誘導性発現のための発現構築物を提供する。

【圖 1-1】

1214-42

[illegible]

【图 2】

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 99/21277

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/82 C12N15/11 A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12N A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>VAN DER KNAAP, E., ET AL: "Expression of an ortholog of replication protein A1 (RPA1) is induced by gibberellin in deepwater rice" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 94, September 1997 (1997-09), pages 9979-9983, XP002131706 WASHINGTON US the whole document -& VAN DER KNAAP, E., ET AL.: "Oryza sativa replication protein A1 (Os-RPA1) mRNA, complete cds" EMBL ACCESSION NO:AF009179, 18 July 1997 (1997-07-18), XP002131707</p> <p style="text-align: center;">-/-</p>	1-3

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 February 2000

Date of mailing of the international search report

13/03/2000

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5618 Patentaan 2
NL - 2260 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-9010

Authorized officer

Maddox, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Int. Application No
PCT/US 99/21277

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DBEST ID:52849, 18 July 1994 (1994-07-18), XP002131708 the whole document & EMBL ACCESSION NO:T23395, 21 July 1994 (1994-07-21),	1,2
X	CHURIN, Y., ET AL.: "Hordeum vulgare cv. Haisa mRNA for cp31BHV protein" EMBL ACCESSION NO:AJ224324, 4 September 1998 (1998-09-04), XP002131709 the whole document	1
X	SHEN, B., ET AL.: "5C04601-T7 membrane-free polysomes from endosperm Zea mays cDNA clone 5C04G01 5' end similar to 60s ribosomal protein L19." EMBL ACCESSION NO:T18701, 14 May 1994 (1994-05-14), XP002131710 the whole document	2
X	ISHIAI, M., ET AL.: "Purification, gene cloning, and reconstitution of the heterotrimeric single-stranded DNA-binding protein from Schizosaccharomyces pombe." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY., vol. 271, 23 August 1996 (1996-08-23), pages 20868-20878, XP002131711 AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD., US ISSN: 0021-9258 figure 2B -& ISHIAI M., ET AL.: "REPLICATION FACTOR-A PROTEIN 2 (SINGLE-STRANDED DNA-BINDING PROTEIN P30 SUBUNIT)." SWISSPROT ACCESSION NO:Q92373, 1 November 1997 (1997-11-01), XP002131712	1,2
X	NAKAMURA, Y., ET AL.: "Arabidopsis thaliana genomic DNA, chromosome 5, P1 clone: MNL12." EMBL ACCESSION NO:AB017070, 3 September 1998 (1998-09-03), XP002131713 nts 6376-6501	2
X	WILSON, R., ET AL.: "Caenorhabditis elegans cosmid K12C11." EMBL ACCESSION NO:AF043701, 23 January 1998 (1998-01-23), XP002131714 see reverse complement of nts 22422-22441	2
P,X	WALBOT, V., ET AL.: DBEST ID:2980430, 22 July 1999 (1999-07-22), XP002131715 the whole document & EMBL ACCESSION NO:AI881882, 23 July 1999 (1999-07-23),	1,2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 99/21277

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WALBOT, V.: DBEST ID:2943612, 15 July 1999 (1999-07-15), XP002131716 the whole document & EMBL ACCESSION NO:AI855065, 22 July 1999 (1999-07-22),	1,2
P,X	WALBOT, V., ET AL.: DBEST ID:2970064, 21 July 1999 (1999-07-21), XP002131717 & EMBL ACCESSION NO:AI881517, 22 July 1999 (1999-07-22),	1,2
P,X	WALBOT, V.: DBEST ID:2922893, 14 July 1999 (1999-07-14), XP002131718 & EMBL ACCESSION NO:AI834577, 16 July 1999 (1999-07-16),	1,2
P,X	WALBOT, V., ET AL.: "606058D02.x2 606 - Ear tissue cDNA library from Schmidt lab Zea mays cDNA, mRNA sequence." EMBL ACCESSION NO:AI770788, 30 June 1999 (1999-06-30), XP002131719 the whole document	2
P,X	WALBOT, V.: "618009B07.x1 618 - Inbred Tassel cDNA Library Zea mays cDNA, mRNA sequence." EMBL ACCESSION NO:AI901688, 28 July 1999 (1999-07-28), XP002131720 the whole document	2
P,X	WALBOT, V.: "605089A07.x1 605 - Endosperm cDNA library from Schmidt lab Zea mays cDNA, mRNA sequence." EMBL ACCESSION NO:AI833411, 14 July 1999 (1999-07-14), XP002131721 the whole document	2
P,X	WALBOT, V., ET AL.: "487012G02.x1 487 - apical meristem cDNA library from Hake lab Zea mays cDNA, mRNA sequence." EMBL ACCESSION NO:AI396192, 5 February 1999 (1999-02-05), XP002131722 the whole document	2
P,X	LIN, X., ET AL.: "Arabidopsis thaliana chromosome II section 137 of 255 of the complete sequence." EMBL ACCESSION NO:AC006403, 18 January 1999 (1999-01-18), XP002131723 the whole document	1,2
A	WO 97 08331 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT ;KLEMM MANFRED (DE); REISS BERND (DE); SCH) 6 March 1997 (1997-03-06) the whole document	8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Initial International Application No.

PCT/US 99/21277

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9708331 A	06-03-1997	EP 0847445 A	17-06-1998

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

Fターム(参考) 2B030 AA02 AB03 AD05 CA06 CA17

CA19 CB02 CD03 CD07 CD09

CD13 CD14 CD21

4B024 AA08 BA80 CA03 DA01 EA04

GA11 GA17

4B063 QA01 QA13 QA18 QQ04 QQ42

QQ53 QR55 QS34

4B065 AAS8X AAS8Y AB01 BA01

CA53

4H045 AA10 CA30 EA05 FA72 FA74